

# **Immunzytologische Charakterisierung bronchoalveolärer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T- Lymphozyten im Rahmen pulmonaler Erkrankungen**

Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und ihre  
diagnostische Bedeutung

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Heike Ferchland  
geboren am 11.08.1975 in Halle/Saale

**Gutachter:**

1. ....
2. ....
3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

# Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
CD	Cluster of Differentiation
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CT	Computertomographie
Cy5	Cytochrom 5
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen der ersten Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen-DR
HR-CT	high resolution computer tomography
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
MAdCAM	mucosal vascular addressin
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
VLA	very late activation antigen

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	4
1 Zusammenfassung .....	7
2 Einleitung .....	9
2.1 Obstruktive und restriktive Lungenerkrankungen .....	9
2.2 Chronisch obstruktive Bronchitis (COPD) .....	10
2.3 Asthma bronchiale .....	13
2.4 Pneumonie .....	14
2.5 Diagnostik von Lungenerkrankungen .....	15
2.5.1 Lungenfunktionsprüfung .....	16
2.5.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	17
2.6 $\alpha^E\beta_7$ -Oberflächenantigen .....	19
3 Ziele der Arbeit .....	22
4 Materialien und Methoden .....	24
4.1 Materialien .....	24
4.1.1 Geräte .....	24
4.1.2 Medikamente .....	24
4.1.3 Chemikalien und Biochemikalien .....	24
4.1.4 Antikörper .....	24
4.1.5 Labortechnische Hilfsmittel .....	25
4.1.6 Färbelösungen .....	25
4.1.7 Verwendete Software .....	25
4.2 Methoden .....	26
4.2.1 Auswahl der Patienten .....	26
4.2.2 Gewinnung, Aufbereitung und Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) .....	28
4.3 Statistische Auswertung .....	33
5 Ergebnisse .....	34
5.1 Analyse der untersuchten Patienten .....	34
5.2 Altersverteilung .....	35
5.3 Analyse des Rauchverhaltens .....	36

5.4	Rückgewinnungsrate („Recovery“) der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) und die Gesamtzellzahl.....	37
5.5	Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)...	38
5.6	Verteilung von CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten .....	42
5.7	Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten .....	45
5.8	Expression von $\alpha^E\beta_7$ auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> - T-Lymphozyten.....	51
5.9	Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7$ zu den Aktivierungsmarkern CD25, HLA-DR und VLA-1 .....	54
5.10	Beziehung zwischen den $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten und der relativen Zahl eosinophiler Granulozyten in der BALF bei allergischem Asthma bronchiale	55
6	Diskussion.....	57
6.1	Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis (COPD).....	57
6.2	Pathogenese und Folgen von fibrotischen Lungenstrukturveränderungen bei der COPD ohne Emphysem und der COPD mit Emphysem.....	58
6.3	Differentialzytologisches und immunologisches Muster der BALF bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen.....	60
6.3.1	Makrophagen .....	61
6.3.2	Lymphozyten.....	61
6.3.3	Neutrophile Granulozyten .....	62
6.3.4	Eosinophile Granulozyten .....	63
6.4	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten .....	63
6.5	Expression von $\alpha^E\beta_7$ auf CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei pulmonalen Erkrankungen .....	65
6.6	Funktion von $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten.....	69
6.7	Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten und der relativen Zahl eosinophiler Granulozyten in der BALF bei allergischem Asthma bronchiale...	71
6.8	Expressionsverhalten der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1	72
6.8.1	Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten.....	72
6.8.2	Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten .....	73

6.8.3	Expression des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten.....	74
6.8.4	Untersuchung des Expressionsverhaltens von CD25, HLA-DR und VLA-1 beim Asthma bronchiale.....	74
6.9	Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7$ und der Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 .....	75
7	Schlußfolgerung .....	77
	Literaturverzeichnis .....	78
	Abbildungsverzeichnis.....	86
	Tabellenverzeichnis.....	89
	Danksagung .....	90
	Lebenslauf.....	91
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	93

# 1 Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung des Expansionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit COPD (chronic obstructive pulmonary disease) ohne Emphysem und bei Patienten mit COPD mit Emphysem.

Den  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten wird eine pathogenetische Rolle beim fibrotischen Lungengewebeumbau zugeschrieben. So wurde in früheren Studien eine vermehrte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei verschiedenen fibrotischen Lungenerkrankungen (idiopathische pulmonale Fibrose, Sarkoidose, exogen allergische Alveolitis) nachgewiesen.

Da auch die COPD mit fibrotischen Lungenstrukturveränderungen einhergeht und das Emphysem zusätzlich durch narbige Reparaturvorgänge gekennzeichnet ist, stellt sich die Frage, ob  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei dieser Lungenerkrankung vermehrt auftreten und ob sich das Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  in Bezug auf  $\text{CD8}^+$  und  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten unterscheidet. Hierzu wurde die Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der COPD ohne Emphysem und der COPD mit Emphysem sowie bei anderen Lungenerkrankungen (Pneumonie und allergisches Asthma bronchiale) und bei einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Darüber hinaus soll untersucht werden, inwieweit sich die strukturellen Veränderungen bei der Entwicklung der COPD ohne Emphysem zur COPD mit Emphysem unterscheiden und ob der Umfang der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten ein Indikator für die Stadien dieser Lungenerkrankung ist. Ferner war die Analyse der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 und deren Korrelation zu der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten von Interesse. Zudem soll untersucht werden, ob bei allergischem Asthma bronchiale eine Korrelation zwischen dem relativen Anteil an eosinophilen Granulozyten und der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten besteht.

Hierfür wurde die BALF von insgesamt 62 Patienten, welche in die Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und in eine gesunde Kontrollgruppe eingeteilt wurden, mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Bei Patienten mit COPD mit Emphysem konnte im Vergleich zu Patienten mit COPD ohne Emphysem eine signifikant erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-

Lymphozyten festgestellt werden. Dies könnte auf die ausgeprägteren fibrotischen Umbauprozesse bei der COPD mit Emphysem zurückzuführen sein. Während bei der COPD ohne Emphysem lediglich eine Atemwegswandfibrose vorliegt, ist die COPD mit Emphysem durch fibrotische Reparaturmechanismen im Rahmen eines Remodelings gekennzeichnet. Aufgrund des differenten Expansionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten können gegebenenfalls Rückschlüsse auf das Vorliegen eines Emphysems gezogen werden. Demgegenüber war die Expansion  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten bei allen Vergleichsgruppen hoch, so dass insoweit keine Rückschlüsse in Bezug auf Lungenerkrankungen möglich sind.

Des weiteren war die Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten der Gruppe COPD mit Emphysem im Vergleich zu den Patienten der Gruppen Asthma und Pneumonie sowie zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auffallend war ferner eine signifikant erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit akuter Pneumonie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Dies könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Entzündungen sein sowie auf eine Beteiligung von  $\alpha^E\beta_7$  an fibrotischen Umbauprozessen bei länger anhaltenden Entzündungen hindeuten.

Bei Lungenerkrankungen mit fibrotischen Veränderungen (z.B. COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem und Asthma bronchiale) war keine Korrelationen zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und den Aktivierungsmarkern CD25, HLA-DR und VLA-1 auf  $\text{CD4}^+$ - und  $\text{CD8}^+$ -T-Lymphozyten nachweisbar. Dies legt den Schluß nahe, dass eine Expression von  $\alpha^E\beta_7$  bei fibrotischen Umbauprozessen der Lungen weder an eine Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD25, noch an die der späten Aktivierungsmarker HLA-DR und VLA-1 gebunden ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse deuten auf einen diagnostischen Nutzen von  $\alpha^E\beta_7$  in Bezug auf das Vorliegen eines Emphysems bei Patienten mit COPD hin. Die Kenntnis der genauen Funktion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten könnte hilfreich sein, um mögliche Therapieoptionen gegen fibrotische Umbauprozesse in der Lunge zu entwickeln.



## 2 Einleitung

Pulmonale Erkrankungen sind ein gravierendes Gesundheitsproblem. Zu den am häufigsten vorkommenden Lungenerkrankungen zählen die COPD, die Pneumonie und das Asthma bronchiale.

Die COPD steht weltweit unter den Todesursachen an 4. Stelle (Lopez und Murray, 1998). Klinisch und lungenfunktionell ist die COPD durch Husten, Auswurf, progrediente Dyspnoe und Reduktion des forcierten expiratorischen Volumens in der ersten Sekunde ( $FEV_1$ ) gekennzeichnet. Zusätzlich finden sich im Komplikationsstadium der COPD mit Emphysem ein erhöhtes intrathorakales Gasvolumen sowie eine verminderte Diffusionskapazität.

Zur Diagnostik von Lungenerkrankungen zählen zudem bildgebende Verfahren und invasive Untersuchungsmethoden, wie die Bronchoskopie mit der transbronchialen Biopsie und die bronchoalveoläre Lavage (BAL). Zunehmende Bedeutung gewinnt die Analyse bestimmter Oberflächenantigene auf Lymphozyten der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). Sie erlaubt Rückschlüsse auf die Aktivität und Pathogenese bestimmter Lungenerkrankungen.

So wurde beispielsweise  $\alpha^E\beta_7$  als Marker für pulmonale Fibrosen beschrieben (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999).

Eine immunzytologische Differenzierung zwischen den pulmonalen Erkrankungen COPD ohne Emphysem bzw. COPD mit Emphysem ist jedoch bisher nicht bekannt.

### 2.1 Obstruktive und restriktive Lungenerkrankungen

Lungenfunktionsstörungen können auf obstruktiven und/oder restriktiven Ursachen beruhen, welche zu obstruktiven und/oder restriktiven Lungenerkrankungen führen.

Obstruktive Lungenerkrankungen machen etwa 90 % aller Lungenfunktionsstörungen aus. Man unterscheidet hierbei zwischen Obstruktionen der oberen extrathorakalen Atemwege, welche bis zum Larynx reichen, und Obstruktionen der unteren intrathorakalen Atemwege, welche vom Larynx bis zu den Bronchioli terminalis reichen. Die Obstruktion der oberen Atemwege verursacht eine

inspiratorische Atembehinderung, welche von einem inspiratorischen Stridor begleitet wird. Ursachen hierfür können zum Beispiel ein Glottis- oder Larynxödem, eine zurückgefallene Zunge, ein Pseudokrupp, eine Rekurrensparese, eine Aspiration oder das Schlafapnoesyndrom sein (Herold et al., 1999).

Die Obstruktion der unteren Atemwege verursacht demgegenüber eine expiratorische Atembehinderung mit verlängertem Expirium. Hierbei unterscheidet man zwischen endobronchialen Obstruktionen, welche beispielsweise durch Muskelspasmus, Schleimhautödem, Hyper- und Dyskrie und Mukostase verursacht werden, und den exobronchialen Obstruktionen. Ursachen für eine Obstruktion der unteren Atemwege können Erkrankungen der Trachea sowie chronisch obstruktive Lungenerkrankungen sein. Zu den chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen zählen die chronisch obstruktive Bronchitis, das Asthma bronchiale sowie das obstruktive Lungenemphysem (Herold et al., 1999).

Im Gegensatz zu obstruktiven Lungenerkrankungen sind restriktive Lungenerkrankungen durch eine Verminderung der mobilisierbaren und nicht-mobilisierbaren Lungenvolumina gekennzeichnet (Herold et al., 1999). Eine Reduktion des Lungenvolumens kann auf einer Verdrängung, Resektion oder Veränderung des Lungenparenchyms, auf einer Veränderung des Thorax oder auf neuromuskulären Erkrankungen beruhen (Bergofsky, 1979).

Im Folgenden sollen bestimmte Lungenerkrankungen (COPD, Asthma bronchiale und Pneumonie), die Diagnostik von Lungenerkrankungen, die Gewinnung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und das Oberflächenantigen  $\alpha^E\beta_7$  näher dargestellt werden.

## **2.2 Chronisch obstruktive Bronchitis (COPD)**

Die COPD kann in die vier Stadien (1) die einfache chronische Bronchitis, (2) die chronische Bronchitis mit reversibler Obstruktion, (3) die chronische Bronchitis mit irreversibler Obstruktion und (4) die chronisch obstruktive Bronchitis mit Lungenemphysem eingeteilt werden (Kroegel, persönliche Mitteilung).

Nach der WHO-Definition ist die chronische Bronchitis „eine Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch übermäßige Schleimproduktion im Bronchialbaum, die sich manifestiert mit andauerndem oder immer wieder auftretendem Husten, mit

oder ohne Auswurf an den meisten Tagen von mindestens drei aufeinanderfolgenden Monaten während mindestens zwei aufeinanderfolgender Jahre“ (WHO, 1961).

Das Krankheitsbild der COPD ist durch eine chronische Bronchitis, eine Erkrankung der schmalen Atemwege (Bronchiolitis) und durch die Bildung von Emphysemen gekennzeichnet und kann in seiner Zusammensetzung bei den Betroffenen variieren (Lomas und Silverman, 2001). Die COPD manifestiert sich oft erst nach dem 40. Lebensjahr (Ullmer und Solèr, 1999). Der Krankheitsverlauf zeichnet sich durch eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion und eine zunehmende Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens aus. Dies wird insbesondere auch durch rezidivierende Exazerbationen hervorgerufen (Worth. et al, 2002). Klassisch für den stabilen Zustand der COPD ist die langsam progrediente Anstrengungsdyspnoe. Akute Verschlechterungen werden in der Mehrzahl der Fälle durch Virusinfekte hervorgerufen. Als klinisches Zeichen einer Exazerbation gelten ein vermehrtes oder purulentes Sputum sowie eine zunehmende Dyspnoe (Ullmer und Solèr, 1999).

Bei der Entstehung der chronischen Bronchitis ist die Exposition gegenüber inhalativen Noxen von herausragender Bedeutung (Ullmer und Solèr, 1999; Lomas und Silverman, 2001). Das Zigarettenrauchen ist mit einem Anteil von 80–90 % der wichtigste ätiologische Faktor (Ullmer und Solèr, 1999). So wurde in verschiedenen Studien eine Korrelation des Fortschreitens der Atemwegsobstruktion mit dem Zigarettenkonsum festgestellt (Dockery et al., 1988; Peat et al., 1989; Worth. et al., 2002). Obwohl nur ungefähr 10-20 % der Raucher eine Atemflußobstruktion entwickeln, ist die COPD vor allem eine Raucher-Erkrankung (Fletcher und Peto, 1977). Eine chronische Irritation der Bronchien durch inhalative Noxen, insbesondere Zigarettenrauch, führt zu einer Hypertrophie und Überfunktion des schleimbildenden Apparates und zum Verlust von funktionstüchtigem Flimmerepithel. Dies begünstigt eine Kolonisation der Atemwege mit Bakterien und die Entstehung von rezidivierenden bronchialen Infektionen. Der Ersatz von Surfactant- und Antiproteasen-bildenden Clara-Zellen durch Pflasterzellen in den kleinen Atemwegen fördert zudem die proteolytische Zerstörung von Bronchial- und Alveolarwänden und die Bildung von Emphysemen (Ullmer und Solèr, 1999).

Aber auch Umweltnoxen und eine berufliche Exposition gegenüber anderen inhalativen Noxen sowie genetische Faktoren können für die Entwicklung einer COPD bedeutsam sein (Ullmer und Solèr, 1999).

Trotz mehrerer Studien konnte als genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD lediglich ein schwerer  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel nachgewiesen werden (Lomas und Silverman, 2001). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass ein  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel und das hierdurch bedingte Emphysemrisiko bei weniger als einem Prozent der COPD-Patienten vorliegt (Ullmer und Solèr, 1999).

Die COPD stellt ein gravierendes Gesundheitsproblem dar und ist eine der Hauptursachen der globalen Morbidität und Mortalität (Wise, 1997). Gegenwärtig nimmt die COPD weltweit den vierten Rang der Todesursachen ein. In den nächsten Jahrzehnten wird ein weiterer Anstieg von Prävalenz, Morbidität und Mortalität erwartet, so dass die COPD bis 2020 auf Rang drei der Todesursachen vorrücken wird (Lopez und Murray, 1998). Bei der erwachsenen deutschen Bevölkerung wird die Prävalenz der COPD auf zwischen 10-15 % geschätzt (Konietzko und Fabel, 2000).

Wie bereits oben ausgeführt, ist die COPD mit Emphysem ein Stadium der COPD. Lungenemphyseme werden meist indirekt aufgrund klinischer Zeichen wie Lungenüberblähung (Faßthorax), Tracheobronchialkollaps und erniedrigter Diffusionskapazität sowie radiologischer Zeichen, gegebenenfalls durch einen CT- bzw. HRCT-Befund (computer tomography bzw. high resolution computer tomography), diagnostiziert. Sie entstehen durch ein Ungleichgewicht von proteolytischen Enzymen und antiproteolytischen Schutzmechanismen (Antiproteasen), welches durch eine vermehrte Freisetzung von Elastase aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Rahmen eines Entzündungsprozesses oder durch einen angeborenen oder erworbenen Mangel an Inhibitoren verursacht werden kann. Bei diesem proteolytischen Ungleichgewicht greifen Proteasen die Kollagen- und Elastinfasern des Lungengerüsts an. Demgegenüber reagieren Antiproteasen sehr empfindlich auf Oxidation und verlieren hierdurch ihre Funktionsfähigkeit. Zigarettenrauch enthält große Mengen an reaktiven Oxidantien. Diese inaktivieren den Proteaseninhibitor  $\alpha_1$ -Antitrypsin, wodurch es zur vermehrten Schädigung des Gewebes durch Elastasen kommt. Endogene Antioxidantien bieten einen Schutz vor diesen

inhalativen (exogenen) oder im Rahmen des Entzündungsprozesses freigesetzten (endogenen) Oxidantien. Ein gestörtes Oxidantien-Antioxidantien-Gleichgewicht begünstigt ebenfalls die Entstehung von Emphysemen (Ullmer und Solèr, 1999).

## **2.3 Asthma bronchiale**

Im Gegensatz zur COPD ist das Asthma bronchiale durch Anfälle von Atemnot gekennzeichnet. Das Asthma bronchiale ist Folge einer bronchialen Hyperreagibilität, welche von einer Atemwegsobstruktion begleitet wird. Die Atemwegsobstruktion ist dabei zwischen den Anfällen ganz oder teilweise reversibel (Matthys, 1988). Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine primär von eosinophilen Granulozyten verursachte Entzündung der Atemwege. Immunhistologisch ist es durch eine Anreicherung aktivierter  $CD4^+$ -T-Lymphozyten und eosinophiler Granulozyten sowie immunologisch durch die Freisetzung von Zytokinen bzw. anderen Mediatoren charakterisiert (Kroegel, 2002).

Grundsätzlich ist, je nach vorhandener oder nicht nachweisbarer allergischer Diathese, zwischen zwei Formen des Asthma bronchiale – (1) dem extrinsischen bzw. allergischen und (2) dem intrinsischen bzw. nichtallergischen Asthma bronchiale - zu unterscheiden (Kroegel, 2002).

Das intrinsische bzw. nichtallergische Asthma bronchiale tritt häufig erst in der 4. oder 5. Lebensdekade auf und entwickelt sich in den meisten Fällen nach einem respiratorischen Infekt. Eine allergische Diathese oder eine Vermehrung des Gesamt- bzw. spezifischen Immunglobulin E (IgE) läßt sich bei dem intrinsischen bzw. nichtallergischen Asthma bronchiale im Gegensatz zum extrinsischen bzw. allergischen Asthma bronchiale nicht nachweisen. Jedoch ist die Eosinophilie im Allgemeinen stärker ausgeprägt und unterliegt, wie die klinische Symptomatik, keinen größeren jahreszeitlichen Schwankungen (Kroegel, 2002). Beim intrinsischen bzw. nichtallergischen Asthma bronchiale kann auch im symptomarmen Intervall sowohl im Blut als auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit eine anhaltende Aktivierung von  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten – gekennzeichnet durch die Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf deren Oberfläche – nachgewiesen werden (Walker et al, 1992). Im Gegensatz zum extrinsischen bzw. allergischen Asthma bronchiale ist beim intrinsischen bzw. nichtallergischen Asthma bronchiale eine

Differenzierung peripherer Lymphozyten in sogenannte Memory-T-Zellen (CD45-RO+) nachweisbar (Kroegel, 2002). Es wird vermutet, dass das intrinsische bzw. nichtallergische Asthma bronchiale eine autoimmunologische Entzündung – zum Beispiel auf ein noch unbekanntes Antigen in der Bronchialschleimhaut – ist (Kroegel et al. 1993).

Das extrinsische bzw. allergische Asthma bronchiale ist im Gegensatz zum intrinsischen bzw. nichtallergischen Asthma bronchiale eine mit Umweltallergenen assoziierte Atemwegserkrankung. Von dem extrinsischen bzw. allergischen Asthma bronchiale sind oft bereits Kinder und Jugendliche mit allergischer Diathese in der Familie betroffen. Sie tritt saisonal rezidivierend mit einer Erhöhung der Eosinophilenzahl im Blut und des Gesamt- und allergenspezifischen IgEs auf (Kroegel, 2002). Gekennzeichnet ist das extrinsische bzw. allergische Asthma bronchiale durch Anfälle von Atemnot, welche vor allem nachts und am frühen Morgen auftreten. Während eines Asthmaanfalls sind über der Lunge trockene Rasselgeräusche, gekennzeichnet durch Giemen, Pfeifen und Brummen, auskultierbar. Das Atemgeräusch ist abgeschwächt und es kann ein expiratorischer Stridor festgestellt werden. Die bronchiale Obstruktion während eines Asthmaanfalls wird durch Ödeme der Schleimhaut, Bronchospasmus und Dyskrinie verursacht (Matthys, 1988). In den Atemwegen können beim extrinsischen bzw. allergischen Asthma bronchiale passagere aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie Th2-zellassozierte Zytokine nachgewiesen werden, welche mit der Allergenexposition im Zusammenhang stehen (Kroegel, 2002). In Biopsien von erwachsenen Patienten mit Asthma bronchiale wurde zudem eine Zerstörung des Oberflächenepithels der Atemwege festgestellt (Ollerenshaw und Woolcock, 1992). Für das Asthma bronchiale ist eine frühzeitige Verdickung der retikulären Basalmembran und eine Infiltration der Wand durch eosinophile Granulozyten und CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hoch charakteristisch, wobei sich die Dicke der retikulären Basalmembran nicht mit dem Alter, der Schwere oder der Dauer des Asthmas verändert (Jeffery, 2001).

## 2.4 Pneumonie

Die Pneumonie ist eine akute oder chronische Entzündung des Lungenparenchyms.

Eine Einteilung der Pneumonie kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen: (1) nach dem betroffenen Lungenparenchym in alveoläre und interstitielle Pneumonie, (2) nach der Lokalisation in lobuläre und Lobärpneumonie und (3) nach dem Infizierungsort in nosokomiale (d.h. im Krankenhaus erworbene) und ambulante (d.h. außerhalb des Krankenhaus erworbene) Pneumonie.

Eine Infizierung des Lungenparenchyms, welches zur Pneumonie führt, kann sowohl durch das Einatmen von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, seltener Pilze und Parasiten erfolgen. Aber auch andere Ursachen, wie zum Beispiel die Inhalation von Reizstoffen, die Aspiration von Magensaft oder eine Strahlentherapie, können zu einer Pneumonie führen. Bei sonst gesunden Patienten heilt eine Pneumonie in der Regel folgenlos ab. Bei älteren Patienten sowie bei Patienten mit einer Immunschwäche oder anderen Begleiterkrankungen kann sie jedoch zum Tode führen.

Das klinische Bild kann sich sehr different darstellen. Eine akute bakterielle Pneumonie manifestiert sich in der Regel mit Schüttelfrost, hohem Fieber, Atemnot, Husten und gegebenenfalls mit atemabhängigen thorakalen Schmerzen. Der Husten ist anfangs trocken, entwickelt sich jedoch später zu einem purulenten Auswurf, welcher blutig tingiert sein kann. Schließlich kann es zu einer Tachypnoe und Zyanose kommen. Demgegenüber beginnen virale oder parasitäre Pneumonien in der Regel weniger akut mit leichtem Fieber ohne Schüttelfrost, begleitet von trockenem Husten ohne Auswurf. Diese beiden Pneumonie-Arten bezeichnet man daher auch als atypische Pneumonien.

Die Pneumonie läßt sich durch klinische, auskultatorische und röntgenologische Diagnostik feststellen. Zudem kann durch die Gewinnung einer bronchoalveolären Lavageflüssigkeit oder einer Blutkultur versucht werden, den Erreger zu identifizieren, um eine gezielte Therapie zu ermöglichen.

## **2.5 Diagnostik von Lungenerkrankungen**

Die Diagnostik von Lungenerkrankungen erfolgt in erster Linie über die Anamnese und die Klinik des Patienten. Des weiteren kann eine Lungenfunktionsprüfung, ein Röntgenthoraxbild, ein CT bzw. HRCT sowie die Bronchoskopie einschließlich der Gewinnung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit sowie deren durchflußzytometrische Analyse hilfreich sein.



Im Folgenden soll die Diagnostik von Lungenerkrankungen durch die Lungenfunktionsprüfung sowie durch die Gewinnung und Untersuchung von bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit erläutert werden.

### **2.5.1 Lungenfunktionsprüfung**

Die Ermittlung der Lungenfunktion erfolgt unter anderem mittels Spirometrie, Bodyplethysmographie, Bronchospasmodolysetest und Bestimmung der Diffusionskapazität. Dabei ist die Spirometrie die klassische Methode zur Beurteilung der Ventilation. Mit der Spirometrie lassen sich statische, wie zum Beispiel die Vitalkapazität, und dynamische Testwerte, wie zum Beispiel die Einsekundenkapazität, ermitteln. Mit wenig Aufwand läßt sich mit der Spirometrie feststellen, ob es sich um eine obstruktive oder eine restriktive Atemwegserkrankung handelt. Die Befunde können hinsichtlich ihres Beschwerdegrades objektiviert werden. Vereinfacht bedeutet eine Verminderung der Vitalkapazität eine Restriktion und eine Verminderung der Ein-Sekunden-Kapazität eine Obstruktion (Boenisch et al., 2003). Bei Vorliegen einer Obstruktion kann mit Hilfe des Bronchospasmodolysetestes überprüft werden, ob diese reversibel, teilweise reversibel oder irreversibel ist (Gillissen et al., 2000).

Die durch die Spirometrie erhaltene Fluß-Volumen-Kurve beinhaltet teils stark mit arbeitsabhängige Bereiche und Bereiche, die nur flußbegrenzend sind. Während der erste Teil des expiratorischen Schenkels der Fluß-Volumen-Kurve Auskunft über die zentralen Atemwege liefert, gibt der Endteil Hinweise über die atemmechanische Beschaffenheit der kleinen Atemwege. Formveränderungen der Fluß-Volumen-Kurve lassen zu einem Rückschlusse auf Ventilationsstörungen, zum anderen aber auch auf die Mitarbeit des Patienten zu. Ein gesunder Mensch kann ca. 75 % seiner Vitalkapazität in der ersten Sekunde forciert ausatmen. Bei einer leichten obstruktiven Ventilationsstörung beträgt das forcierte Expirationsvolumen der ersten Sekunde ( $FEV_1$ ) dagegen nur 60 %, bei einer mittelschweren obstruktiven Ventilationsstörung nur 40-60 % und bei einer schweren obstruktiven Ventilationsstörung weniger als 40 %. Bei obstruktiven Ventilationsstörungen kommt es zu einer Reduktion des Spitzenflusses. Ferner ist der expiratorische Kurvenverlauf aufgrund einer Verringerung der expiratorischen Flüsse über den gesamten Ausatemungsbereich konvex deformiert. Dabei hängt der Grad der Deformierung vom Schweregrad der Obstruktion ab. Bei der



restriktiven Ventilationsstörung ist die Kurvenachse dagegen im Sinne der Volumenverminderung gestaucht, wobei jedoch die eigentliche Form der Fluß-Volumen-Kurve weitgehend erhalten bleibt. Die Flüsse zu den verschiedenen Volumina sowie der Spitzenfluß sind nicht pathologisch verändert (Boenisch et al., 2003). Bei der kombinierten Ventilationsstörung verändert sich die Kurve im Sinne einer Obstruktion und einer Restriktion.

Mit der Volumen-Zeit-Kurve läßt sich sowohl der Grad einer Ventilationsstörung als auch die betroffenen Atemwege bestimmen. Auch periphere obstruktive Ventilationsstörungen (sogenannte small-airway-disease) sind an der Fluß-Volumen-Kurve erkennbar, also bereits dann, wenn die Ein-Sekunden-Kapazität und der Spitzenfluß noch normal sind. Eine Einschränkung des Flusses bei 75 % der noch auszuatmenden forcierten Vitalkapazität weist auf eine Obstruktion der großen Atemwege hin (Boenisch et al., 2003). Bei instabilen Atemwegen, wie sie zum Beispiel beim Emphysem vorhanden sind, kommt es zu einem expiratorischen Bronchiolenkollaps, dem sogenannten „check-valve“-Phänomen. Man erkennt es beim Tiffeneau-Test an einem frühexpiratorischen Knick mit anschließend flacherem Kurvenverlauf in der Spirogrammkurve bzw. im Fluß-Volumen-Diagramm (Herold et al., 1999).

Vor allem im Frühstadium ist die Einteilung von COPD-Patienten in Patientengruppen mit chronisch obstruktiver Bronchitis mit oder ohne Lungenemphysem durch die Lungenfunktionsanalyse häufig schwierig (Worth H. et al., 2002). Hier können weitere diagnostische Methoden, insbesondere die bronchoalveoläre Lavage (BAL), hilfreich sein.

### **2.5.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Ursprünglich wurde die bronchoalveoläre Lavage (BAL) lediglich zur Therapie bestimmter Lungenerkrankungen angewandt. Hierbei wurden die Lungen zur Entfernung von Schleim bzw. eiweißreichem Exsudat mit großen Flüssigkeitsmengen gespült. Durchgeführt wurde sie zum Beispiel zur Behandlung der Mukoviscidose, der Alveolarproteinose als auch des Asthma bronchiale (Kylstra et al., 1971; Selecky et al., 1977). Erst durch die Analyse der zellulären Bestandteile der Spülflüssigkeit wurde die Bedeutung der BAL für die Diagnostik, aber auch für die pathogenetische Deutung interstitieller Lungenerkrankungen

erkannt (Reynolds und Newball 1974; Hunninghake et al., 1979). Reynolds und Newball wandten 1974 als erste das heute übliche Verfahren der diagnostischen BAL über das Fiberglasbronchoskop in Lokalanästhesie an (Reynolds und Newball, 1974). Die Durchführung der diagnostischen BAL erfolgte anfänglich nur bei unklaren interstitiellen Lungenerkrankungen. Später wurde die Indikation auf HIV-Patienten (Erregernachweis) und Lungentransplantierte ausgeweitet und wird heute bei fast allen unklaren Bildern angewendet. Die klassischen Indikationen sind jedoch nach wie vor die Sarkoidose, die Alveolitis und die idiopathische pulmonale Fibrose (Mikuz und Gschwendtner, 2000).

Mit der diagnostischen BAL können auf wenig invasive Weise Zellen, inhalierte Staubpartikel, Krankheitserreger und flüssige Bestandteile aus den terminalen Bronchiolen und Alveolen gewonnen werden (Costabel, 1994). Heute ist die BAL die am wenigsten invasive Methode zur Beurteilung des Immunstatus der Lunge und unterstützt die Diagnose- und Prognosestellung respiratorischer Krankheiten. Die Analyse der T-Zell-Aktivierung in der Lunge von Patienten mit Lungenerkrankungen ist von Interesse, um Hinweise für die Pathogenese, die Entwicklung, die Diagnostik sowie die Prognose von Lungenerkrankungen und mögliche Therapieansätze zu erlangen. Dabei werden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene in Kombination mit durchflußzytometrischen Techniken zur Untersuchung des Phänotyps von BAL-Lymphozyten genutzt. Hierdurch kann ein indirekter Einblick in die funktionelle Aktivität der BAL-Lymphozyten gewonnen werden (Ancochea et al., 1993). Es ist allgemein bekannt, dass die Expression bestimmter Oberflächenantigene den Aktivierungs- / Differenzierungs-Grad von Lymphozyten widerspiegelt. Zudem konnten einige Oberflächenantigene als Rezeptoren charakterisiert werden, welche an trophischen Funktionen während der Zellaktivierung beteiligt sind (Ullman et al., 1990).

Die auf der epithelialen Oberfläche befindlichen zellulären Bestandteile und Proteinkomponenten können mit großer Genauigkeit die sich im unteren Respirationstrakt abspielenden immun-entzündlichen Vorgänge widerspiegeln (Gadek et al., 1979; Hunninghake et al., 1979).

Da durch die BAL zum ersten Mal eine unmittelbare und wiederholte Untersuchung der verschiedenen beteiligten Komponenten und deren Funktion

möglich wurde, hat dieses Verfahren auch wesentlich zur Gewinnung neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der zellulären Immunreaktion in der Lunge beigetragen (Rubin, 1985).

## 2.6 $\alpha^E\beta_7$ -Oberflächenantigen

Das  $\alpha^E\beta_7$ -Oberflächenantigen, auch CD103 genannt, ist ein Integrin, welches vermehrt auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bei fibrotischen Lungenerkrankungen auftritt (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999).

Integrine gehören zu den Zelloberflächenadhäsionsmolekülen und sind an diversen zellulären- und Entwicklungsprozessen, einschließlich der Morphogenese, Hämostase, Leukozytenaktivierung, Zelladhäsion und „Homing“, beteiligt (Hynes, 1992).

Bei Integrinen handelt es sich um transmembranäre, heterodimere Glykoproteine, welche aus einem nicht-kovalent verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten-Paar zusammengesetzt sind. Bislang sind 14  $\alpha$ -Ketten und 8  $\beta$ -Ketten bekannt. Wegen der großen Kombinationsmöglichkeiten zwischen je einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette können mindestens 20 verschiedene heterodimere Integrine gebildet werden (Shaw et al., 1994). Diese können aufgrund ihrer unterschiedlichen  $\beta$ -Ketten in mehrere große Subfamilien eingeteilt werden (Hynes, 1992). Die extrazellulären Domänen von heterodimeren Integrinen enthalten Ligandenbindungsstellen, die mit extrazellulären Matrixmolekülen oder mit anderen Zelloberflächenintegralmembranmolekülen Wechselwirkungen ausüben, um Adhäsionen zu vermitteln (Shaw et al., 1994). Manche Integrine, wie zum Beispiel die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ), Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) und p150,95 ( $\alpha_X\beta_2$ ), werden ausschließlich auf Leukozyten exprimiert. Andere Integrine, wie zum Beispiel die  $\beta_1$ -Integrine VLA-1 – VLA-6 ( $\alpha_1\beta_1$  –  $\alpha_6\beta_1$ ), werden dagegen auch auf anderen Zellen exprimiert. Die meisten Integrine können an mehr als einen Liganden binden (Erle et al., 1993).

Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  setzt sich aus den Untereinheiten  $\alpha^E$  und  $\beta_7$  zusammen. Die  $\beta_7$ -Integrin-Untereinheit wird nur von Leukozyten exprimiert und kann mit zwei verschiedenen  $\alpha$ -Ketten,  $\alpha^4$  (CD49d) und  $\alpha^E$  (CD103), verbunden sein (Kilshaw und Murant, 1991; Hynes, 1992). Dabei kann  $\alpha^E$  nur an  $\beta_7$  binden. Sowohl die Expression von  $\alpha^4\beta_7$  als auch die von  $\alpha^E\beta_7$  ist hauptsächlich auf

Lymphozytenuntergruppen beschränkt. Das Integrin  $\alpha^4\beta_7$  wird auf zirkulierenden T-Zellen exprimiert und vermittelt die Adhäsion zum mucosal vascular addressin (MAdCAM-1), einer Schleimhautstruktur, die wahrscheinlich für das Lymphozytenhoming zu den Peyer'schen Plaques wichtig ist (Berlin et al., 1993). Demgegenüber wird die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  fast ausschließlich bei intraepithelialen Lymphozyten und bei Lymphozyten der Lamina propria im Schleimhautgewebe beobachtet (Kilshaw und Murant, 1990; Cerf-Bensussan et al., 1992; Kilshaw, 1993). Nur ein sehr kleiner Teil wurde auch in anderen lymphoiden Geweben und im Blut nachgewiesen (Kilshaw und Karecla, 1997). Das Integrin  $\alpha^E\beta_7$  bindet an E-Cadherin, welches sich an der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen befindet. Dabei könnte diese Interaktion für die Rückhaltung und Funktion der T-Lymphozyten im Epithel dienen (Cepec et al., 1994; Karecla et al., 1995).

Alle intraepithelialen Lymphozyten (IELs) des Darmepithels und die meisten T-Lymphozyten der Lamina propria, die dem Epithel benachbart sind, exprimieren sehr stark  $\alpha^E\beta_7$ . Damit ist  $\alpha^E\beta_7$  das vorherrschende Adhäsionsmolekül auf ihrer Oberfläche (Kilshaw und Karecla, 1997). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine *in-vitro* Stimulation von peripheren Blutlymphozyten mit Mitoseauslöser, Phorbol ester, Antigenen und IL-2 die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  induziert (Schieferdecker et al., 1990; Brew et al., 1995). Darüber hinaus stimuliert die Zugabe von TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf T-Lymphozyten bei *in-vitro* Experimenten (Cepec et al., 1993). Durch eine *in-vitro*-Stimulation von T-Lymphozyten mit TGF- $\beta$  wurde eine Expression von  $\alpha^E\beta_7$  bei bis zu 80 % der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass TGF- $\beta$  einer der Hauptfaktoren für die Induktion dieses Integrins auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ist. Demgegenüber exprimieren weniger als 10 % der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach einer *in-vitro*-Stimulation  $\alpha^E\beta_7$  und die Zugabe von TGF- $\beta$  erhöht diese Anzahl lediglich auf bis zu 30 % (Rihs et al., 1996).

TGF- $\beta$  kommt reichlich in den distalen Zottenregionen des Darmepithels vor (Barnard et al., 1993) und regt die Synthese von  $\alpha^E$  in den T-Lymphozyten an, wenn diese das Mikromilieu des Epithels erreichen. Die  $\alpha^4$ -Untereinheit wird dabei auf den IELs reduziert und fast vollständig durch  $\alpha^E$  ersetzt (Kilshaw und Karecla, 1997).

T-Lymphozyten, die das  $\alpha^E\beta_7$ -Integrin exprimieren, können auch in Gewebe nachgewiesen werden, welches kein Schleimhautgewebe ist und einen hohen Spiegel an TGF- $\beta$  enthält. Hierzu zählt zum Beispiel die rheumatische Gelenkhaut (Trollmo et al., 1996). Das  $\alpha^E\beta_7$ -Integrin wird zudem von einer großen Anzahl von Lymphozyten des Bronchialepithels, auf Alveolarwandlymphozyten und auf den T-Lymphozyten der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von gesunden Personen exprimiert. Dies legt den Schluß nahe, dass dieses Integrin die Lokalisation und/oder Bindung von einzelnen T-Lymphozyten-Untertypen im Bronchialschleimhautepithel vermittelt (Erle et al., 1994; Rihs et al., 1996).

Dem TGF- $\beta$  wird zudem eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der Lungenfibrose zugerechnet (Brockelmann et al., 1991; Khalil et al., 1991; Giri et al., 1993). Es wird eine Beziehung zwischen  $\alpha^E\beta_7$  und der Lungenfibrose vermutet, da TGF- $\beta$  als einer der Hauptfaktoren bei der Entstehung der Lungenfibrose die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  dramatisch steigert (Giri et al., 1993; Erle et al., 1994; Rihs et al., 1996). So zeigt sich bei fibrotischen Lungenerkrankungen eine stärkere Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999).

### 3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der Funktion und Bedeutung von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der Entstehung und Entwicklung von Lungenerkrankungen.

$\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten sind möglicherweise an der Entstehung und Aufrechterhaltung von fibrotischen Prozessen in der Lunge beteiligt. So ist bei Lungenerkrankungen, die mit fibrotischen Strukturveränderungen einhergehen, eine Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten feststellbar, während sich die Zahl anderer  $\alpha^E\beta_7$  exprimierender Lymphozyten-Subpopulationen nicht ändert. Dies wurde beispielsweise für die idiopathische pulmonale Fibrose, die Sarkoidose und die exogen allergische Alveolitis nachgewiesen (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999). Auch bei der COPD finden fibrotische Umbauprozesse statt, welche sich in der Entstehung einer Atemwegswandfibrose manifestieren. Zusätzlich kommt es im Komplikationsstadium der COPD mit Emphysem im Rahmen von Reparaturmechanismen und Remodeling zur Bildung von fibrotischem Gewebe (Vlahovic et al., 1999).

Die Untersuchung des Expansionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei unterschiedlichen Manifestationsformen der COPD ist deshalb von Interesse. Hierzu soll die Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem verglichen werden. Diese Ergebnisse sollen zudem mit dem Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei anderen Lungenerkrankungen (Pneumonie, Asthma bronchiale) sowie einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, inwieweit sich die strukturellen Veränderungen bei der Entwicklung der COPD ohne Emphysem zur COPD mit Emphysem unterscheiden und ob der Umfang der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten ein Indikator für die Stadien dieser Lungenerkrankung ist. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei akuten Entzündungen (Pneumonie) im Vergleich zu chronischen Entzündungen (COPD, Asthma bronchiale) und zu gesunden Kontrollen. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist ein besseres Verständnis der Funktion und Bedeutung der  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit ist die Analyse des frühen Aktivierungsmarkers CD25 sowie der späten Aktivierungsmarker HLA-DR und VLA-1 auf bronchoalveolären CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei verschiedenen Lungenerkrankungen, um festzustellen, ob diese die jeweilige Entzündungssituation widerspiegeln. Schließlich soll untersucht werden, ob zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und den frühen bzw. späten Aktivierungsmarkern auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein Zusammenhang besteht.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Durchflußzytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flexibles Bronchoskop (BF-1T240, BF-1T40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, D
Kühlzentrifuge Rotanta 96 RS	Hettich, Tuttlingen, D
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Jena, D
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Pittsburgh, USA

#### 4.1.2 Medikamente

Dicodid® Injektionslösung	Knoll Deutschland, Ludwigshafen, D
Xylocain® Pumpspray Lösung	AstraZeneca, Wedel, D

#### 4.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

PBS	Bio Concept, Allschwil, CH
Toluidinblau	Fluka Chemie, Buchs, CH
FCS	Gibco BRL Life Technologies, Rockville, USA
Light Green	Fluka Chemie, Buchs, CH
Saponin	Sigma, St. Louis, USA

#### 4.1.4 Antikörper

CD103-FITC	Immunotech, Marseille, F
CD103-PE	Dako, Glostrup, DK
CD25-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
CD3-Cy5	Pharmingen, San Diego, USA
CD4-PE	Pharmingen, San Diego, USA
CD8-APC	Pharmingen, San Diego, USA



CD8-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
CD8-FITC/ CD4-PE/ CD3-Cy5	Dako, Glostrup, DK
HLA-DR-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
VLA-1-PE	Pharmingen, San Diego, USA

#### 4.1.5 Labortechnische Hilfsmittel

Gaze 10x10 mm	Rauscher, Oberdorf, D
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, D
5 ml-Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Heidelberg, D
50 ml-Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Heidelberg, D

#### 4.1.6 Färbelösungen

Kimuralösung:

- 11,0 ml Toluidinblau-Lösung 0,05 %
- 5 ml PBS, pH 6,4; 0,1 M
- 0,8 ml Light Green 0,03 %
- 0,5 ml Saponin, gesättigt in 50 % Ethanol

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung gut gemischt und steril filtriert.

May-Grünwald	Sigma, St. Louis, USA
- Verwendung der Stammlösung	

Giemsa	Sigma, St. Louis, USA
- Verdünnung der Stammlösung 1:20 mit destilliertem Wasser	

#### 4.1.7 Verwendete Software

FACS-Auswertungssoftware CellQuest Version 3.1, für Apple Macintosh  
 SigmaPlot 5.0  
 SPSS 10.0 for Windows  
 Microsoft Excel 2000

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Auswahl der Patienten**

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die Daten von insgesamt 494 Patienten, bei denen im Zeitraum vom Anfang November 1997 bis Ende Juli 2000 eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) in der pneumologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt wurde, analysiert. Hiervon wurden nur die Patienten in den fünf Vergleichsgruppen (1) COPD ohne Emphysem, (2) COPD mit Emphysem, (3) Pneumonie, (4) Asthma und (5) gesunde Kontrollgruppe eingeschlossen, bei denen eine eindeutige Diagnose gestellt sowie weitere pulmonale und systemische Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten.

Bei sämtlichen eingeschlossenen Patienten wurden diagnostische BALs durchgeführt. Patienten mit COPD wurden auf das Vorliegen von Emphysemen anhand des klinischen Befundes, der Lungenfunktionsprüfung, der Diffusionskapazität, der Blutgasanalyse und mittels HRCT untersucht. Die Gruppe der Asthmatiker bestand aus Probanden mit leichtem allergischen Asthma bronchiale. Bei dieser Patientengruppe wurden BALs im Rahmen einer Parallelstudie durchgeführt. In die gesunde Kontrollgruppe wurden nur Patienten aufgenommen, bei denen pulmonale und systemische Erkrankungen sicher ausgeschlossen werden konnten. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Durchführung der BAL immunkompetent und unterlagen keiner systemischen Immuntherapie.

Voraussetzung für die Aufnahme der Patienten in eine der fünf Vergleichsgruppen war eine gesicherte Diagnose, der Ausschluß weiterer pulmonaler und systemischer Erkrankungen sowie das Fehlen einer systemischen Immuntherapie.

#### **4.2.1.1 Patienten mit COPD ohne Emphysem**

In der Gruppe COPD ohne Emphysem wurden Patienten zusammengefaßt, bei denen eine chronisch obstruktive Bronchitis ohne Emphysem vorlag. Sie umfaßte die Stadien der einfachen chronischen Bronchitis, der chronischen Bronchitis mit reversibler Obstruktion und der chronischen Bronchitis mit irreversibler Obstruktion. Die Diagnose der COPD wurde bei diesen Patienten sowohl

anamnestisch, klinisch und lungenfunktionell gestellt. Bei diesen Patienten konnte mittels Lungenfunktionsprüfung und HRCT das Vorliegen eines Emphysem ausgeschlossen werden. Die Gruppe COPD ohne Emphysem bestand aus 15 Patienten im Alter von 41 bis 72 Jahren (medianes Alter: 58 Jahre). Dabei handelt es sich um 12 männliche und 3 weibliche Patienten.

#### **4.2.1.2 Patienten mit COPD mit Emphysem**

Die Patienten, die in die Gruppe COPD mit Emphysem aufgenommen wurden, mußten die gleichen Kriterien wie die Patienten der Gruppe COPD ohne Emphysem erfüllen. Zusätzlich mußten emphysematöse Lungenstrukturveränderungen im HRCT und charakteristische Veränderungen im Lungenfunktionstest (Resistanceschleife, persistierende Überblähung, Diffusionsstörung) nachweisbar sein. Bei sämtlichen Patienten konnte ein  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel ausgeschlossen werden. In die Gruppe COPD mit Emphysem ließen sich 10 Patienten im Alter von 36 bis 68 Jahren (medianes Alter: 58 Jahre) einordnen. Hierbei handelte es sich um 9 männliche und einen weiblichen Patienten. Von diesen Patienten wurden 6 im Rahmen einer Parallelstudie lavagiert.

#### **4.2.1.3 Patienten mit Pneumonie**

In die Gruppe Pneumonie wurden Patienten mit einer klinisch nachgewiesenen akuten Pneumonie aufgenommen. Hierbei wurden verschiedene Pneumoniearten zusammengefaßt, deren unterschiedliche Erreger oft nicht feststellbar waren. Diese Gruppe bestand aus 17 Patienten im Alter von 26 bis 84 Jahren (medianes Alter: 54 Jahre). Dabei handelte es sich um 10 männliche und 7 weibliche Patienten.

#### **4.2.1.4 Patienten mit leichtem allergischen Asthma bronchiale**

Bei den 8 Patienten der Gruppe Asthma handelte es sich um 3 männliche und 5 weibliche Patienten im Alter von 21 bis 27 Jahren (medianes Alter: 22,5 Jahre) mit leichtem allergischen Asthma bronchiale des Schweregrades I. Sie wurden im Rahmen einer Parallelstudie zur Segmentalen Allergenprovokation lavagiert. Die für diese Arbeit verwendeten Daten beziehen sich auf die Lavage des Kontrollsegmentes (6er Segment links).

#### 4.2.1.5 Gesunde Kontrollgruppe

Die Gruppe Kontrolle bestand aus 12 Patienten im Alter von 7 bis 61 Jahren (medianes Alter: 40 Jahre), die aufgrund von subjektiven Lungenbeschwerden lavagiert wurden und bei denen eine Lungenerkrankung ausgeschlossen werden konnte. Hierbei handelte es sich um 9 männliche und 3 weibliche Patienten.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der ausgewerteten Patientengruppen**

	n	männlich	weiblich	medianes Alter
<b>COPD ohne Emphysem</b>	15	12 (80%)	3 (20%)	58
<b>COPD mit Emphysem</b>	10	9 (90%)	1 (10%)	58
<b>Pneumonie</b>	17	10 (59%)	7 (41%)	54
<b>Asthma</b>	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)	22,5
<b>Kontrolle</b>	12	9 (75%)	3 (25%)	40

#### 4.2.2 Gewinnung, Aufbereitung und Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

##### 4.2.2.1 Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

Die Patienten wurden mit einem flexiblen Bronchoskop untersucht, nachdem eine Prämedikation mit einer Ampulle Dicodid® Injektionslösung und eine Lokalanästhesie des Rachens mit 2 %-igem Xylocain® Pumpspray durchgeführt wurde. Um eine Kontamination der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) mit Blut zu verhindern, wurde die BAL vor den weiteren diagnostischen Maßnahmen wie der Bürstenzytologie und der transbronchialen Biopsie durchgeführt. Dabei wurden die betroffenen Segmente bzw. bei generalisierten Lungenerkrankungen die Mittellappen oder die Lingula bevorzugt. Prinzipiell können Lavagen auch in anderen Bereichen des Ober- und Unterlappens durchgeführt werden, jedoch ist hier die Rückgewinnung der instillierten Flüssigkeit aufgrund anatomischer Gegebenheiten meist gering. Die zu untersuchenden Lungensegmente wurden mit jeweils 5x20 ml angewärmter steriler physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Die Flüssigkeit wurde nach jeder Instillation wieder vorsichtig aspiriert. Hierfür wurden Spritzen mit einem Drei-Wege-System benutzt, welche sowohl mit dem Arbeitskanal des Bronchoskops

sowie mit einem Absauggerät verbunden sind. Durch Justieren des Drei-Wege-Hahns ist es möglich, sofort nach der Instillation der angewärmten physiologischen Kochsalzlösung die Flüssigkeit wieder zu aspirieren. In der Regel werden etwa 40-60 % des eingeführten Volumens wiedergewonnen. Bei den vorgenommenen Untersuchungen wurde die zurückgewonnene Flüssigkeit („Recovery“) bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt und umgehend der weiteren Analyse unterzogen.

#### **4.2.2.2 Aufbereitung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)**

Die gewonnene BALF wurde durch eine 4-lagige Mullgaze filtriert, um größere Schleimbeimengungen zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Volumenbestimmung in einem 50 ml Reagenzglas. Danach wurde die BALF 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 bis 2 ml Waschpuffer PBS/2%FCS (phosphate buffered saline und fetal calf serum) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der BALF.

#### **4.2.2.3 Immunologische Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die immunologische Untersuchung der BALF durch die Bestimmung der Zellzahl, durch die Zelldifferenzierung sowie mittels der Durchflußzytometrie.

##### **4.2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Volumenteil Zellsuspension mit neun Volumenteilen Kimuralösung gemischt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl des mittleren Zählfeldes mit  $10^5$  multipliziert gibt dabei die Zellkonzentration pro ml an. Die Suspension wurde anschließend mit einem entsprechenden Volumen PBS/2%FCS auf eine Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml für die folgenden Analysen eingestellt.

##### **4.2.2.3.2 Zelldifferentialbild**

Die zytologische Auswertung der BAL-Zellen erfolgte nach Zytozentrifugation und anschließender Färbung (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) per Hand unter einem

Lichtmikroskop (Zeiss, Axiolab, Jena, Deutschland). Hierzu wurden 100 µl PBS/2%FCS mit 100 µl der auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellten Zellsuspension in einem Zytocentrifugen-Röhrchen vermischt und anschließend in der Zytocentrifuge bei 800U/l für 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das so gewonnene Präparat mit einer May-Grünwald/Giemsa-Lösung gefärbt. Hierfür wurde das Präparat zunächst für 20 Minuten in die Färbelösung nach May-Grünwald gegeben, danach mit destilliertem Wasser abgespült und dann für weitere 10 Minuten in die Giemsa-Farblösung gestellt. Nachdem das Präparat getrocknet war, erfolgte mit dem Lichtmikroskop die differentielle Auszählung von 200 nichtepithelialen Zellen.

#### 4.2.2.3.3 Durchflußzytometrische Analyse von Oberflächenantigenen

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, mit welchem Zellpopulationen nach verschiedenen physikalischen Eigenschaften und nach dem Expressionsverhalten definierter Oberflächenantigene analysiert werden können. Mit Hilfe der Fluoreszenztechnik konnten die Zellen auf weitere Eigenschaften, hier vor allem auf das Vorliegen von Oberflächenantigenen, untersucht werden.

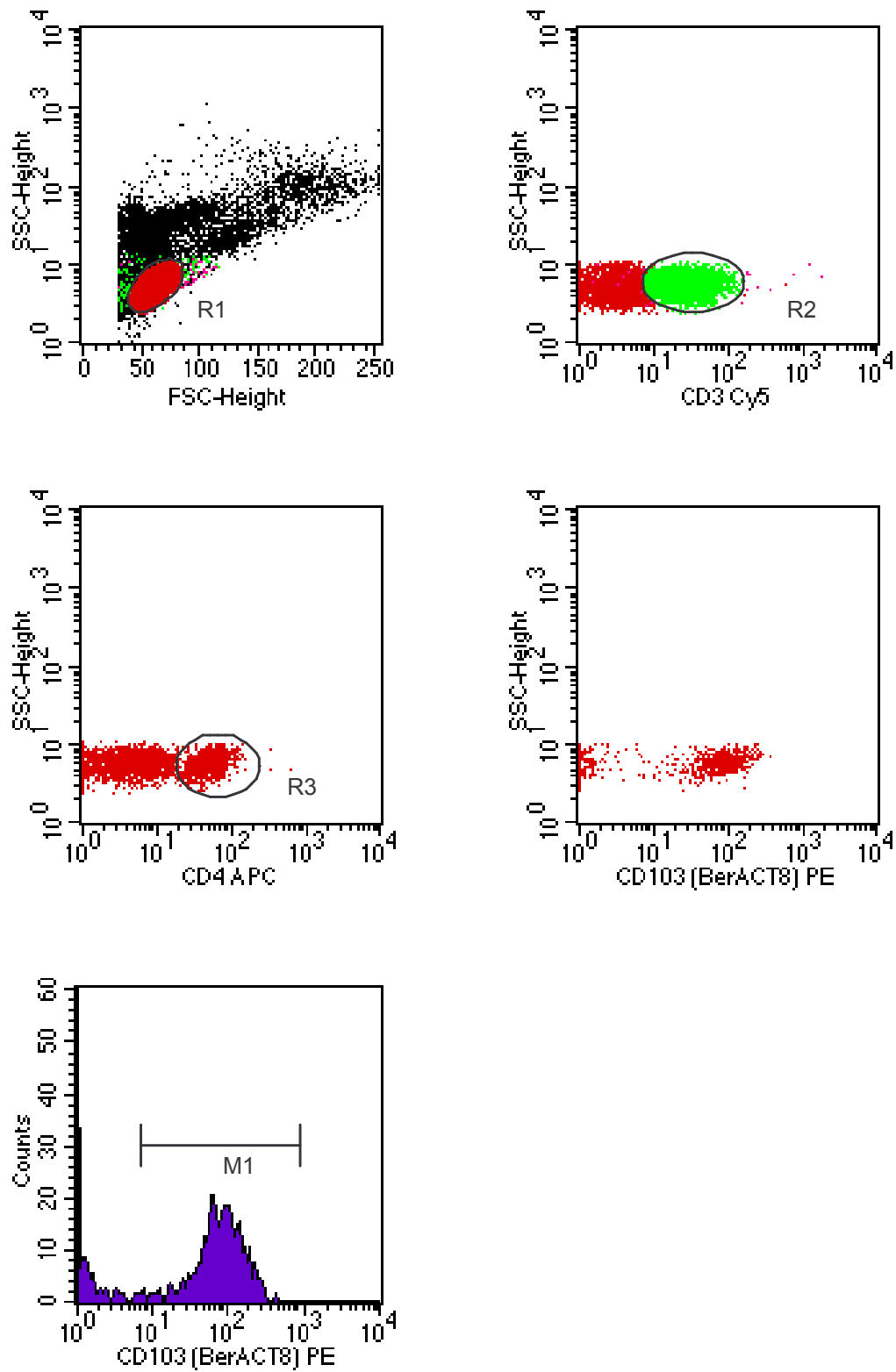
Dazu wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper mit den Zellen inkubiert. 100 µl der auf  $1 \times 10^6$  pro ml eingestellten Zellsuspension wurden mit je 10 µl fluoreszenzmarkierten Antikörpern in 5 ml-Reaktionsgefäßen für eine halbe Stunde im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Dabei setzen sich die fluoreszierenden Antikörper auf diejenigen Zellen, die das zu untersuchende Oberflächenantigen aufweisen. Anschließend erfolgt ein zweimaliges Waschen mit 2 ml PBS/2%FCS. Nach Durchführung einer Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 300 µl PBS/2%FCS resuspendiert. Danach erfolgte die durchflußzytometrische Messung der Zellen. Hierbei werden  $1 \times 10^5$  Zellen gezählt. Dabei fließt jede einzelne Zelle hintereinander durch eine Meßkammer und wird von einem Laserstrahl erfaßt.

Als erstes werden die Zellen anhand ihres Streulichtes differenziert. Das Streulicht einer Zelle hängt dabei von der Größe der Zelle, aber auch von ihrer Beschaffenheit, vor allem ihrer Granularität, ab. Im Vorwärtsstreulicht wird vor allem die Größe der Zelle analysiert. Es besteht eine direkte Beziehung zwischen Streulicht und Zellgröße. Im Seitwärtsstreulicht wird neben der Größe der Zelle vor allem ihre Granularität analysiert. Dabei ist das Seitwärtsstreulicht um so größer, je mehr Granularität die Zelle besitzt.

Die Ergebnisse der Streulichtverhältnisse werden in einem Dot-Plot dargestellt, wobei auf der Abszisse das Vorwärtsstreulicht und auf der Ordinate das Seitwärtsstreulicht aufgetragen werden. Im Dot-Plot werden Zellen und Objekte mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften als Haufen dargestellt. Dabei entspricht jeder Punkt einem Objekt, wobei es sich nicht bei jedem Punkt um eine Zelle handeln muß. Die kleinen, wenig granulierten Zellen entsprechen den Lymphozyten, die großen, wenig granulierten den Monozyten und die großen, stark granulierten den neutrophilen Granulozyten.

Durch Gaten im Durchflußzytometer kann man sich auf die Analyse nur einer Zellgruppe, zum Beispiel die Lymphozyten, beschränken. Dazu zeichnet man eine Region im Streulichtdiagramm ein, welche zum Beispiel nur die Lymphozyten enthält. Diese Region wird R1 genannt. Anschließend erfolgt die Analysierung der jeweiligen Zellgruppe in Bezug auf das zu untersuchende Oberflächenantigen. Dabei gattet (schleust) das Computerprogramm nun die Zellen aus der Region R1 in den Fluoreszenz-Dot-Plot. Beim Durchqueren des Laserstrahles leuchten die fluoreszenzmarkierten Zellen auf.

Mit dem bei den vorgenommenen Untersuchungen verwendeten Durchflußzytometer war die gleichzeitige Messung von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und somit die gleichzeitige Analyse von vier verschiedenen Oberflächenantigenen möglich. Dabei emittiert Fluoresceinisothiocyanat (FITC) grünes Licht der Wellenlänge 519 nm, Phycoerythrin (PE) gelbes Licht von 578 nm, Cytochrom 5 (Cy5) rotes Licht von 670 nm und Allophycocyanin (APC) rotes Licht von 660 nm. Durchquert beispielsweise eine Zelle, die mit einem Cytochrom 5-markierten-Antikörper versehen ist, den Laserstrahl, so leuchtet die Zelle rot auf. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung werden wiederum im Dot-Plot dargestellt.



**Abbildung 1:**  $\alpha^E\beta_7$  „gating method“ der durchflußzytometrischen Analyse.



### 4.3 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung der erhaltenen Daten war zu berücksichtigen, dass es sich um metrische Datentypen handelte, die nicht normalverteilt waren. Zur Charakterisierung der Variablen bei vorliegender schiefer Verteilung erfolgt die Angabe in Median zuzüglich Maximum und Minimum. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Ein signifikanter Unterschied liegt dann vor, wenn  $p$  kleiner 0,05 ist. Es werden auch  $p$ -Werte zwischen 0,05 und 0,1 vermerkt, die eine marginale Signifikanz anzeigen und als empirische Tendenz in eine Richtung interpretiert werden können.

Die Berechnung von Median, Maximum und Minimum erfolgte mit Microsoft Excel 2000, die Berechnungen zum Mann-Whitney-U-Test mit dem Computerprogramm SPSS 10,0 für Windows. Die Daten in den Graphiken sind, soweit nicht anders angegeben, in Form von Box-Plots unter Verwendung des Computerprogramms SigmaPlot 5,0 dargestellt. Box-Plots sind graphische Darstellungen von Verteilungsstatistiken, um eine zentrale Tendenz, Streuung, Schiefe und Spannweite von Verteilungen einschließlich möglicher Ausreißer in einem Bild darstellen zu können. Die Box umfaßt dabei die mittleren 50 % der Verteilung und reicht daher von der unteren 25 %-Perzentile bis zur oberen 75 %-Perzentile. Der Median wird durch einen horizontalen Strich an der entsprechenden Stelle in der Box gekennzeichnet. Die horizontalen Linien unter- und oberhalb der Box (die sog. „whiskers“) markieren die 10 %-Perzentile und die 90 %-Perzentile. Zudem werden Ausreißer außerhalb dieser Verteilung als einzelne Punkte dargestellt.

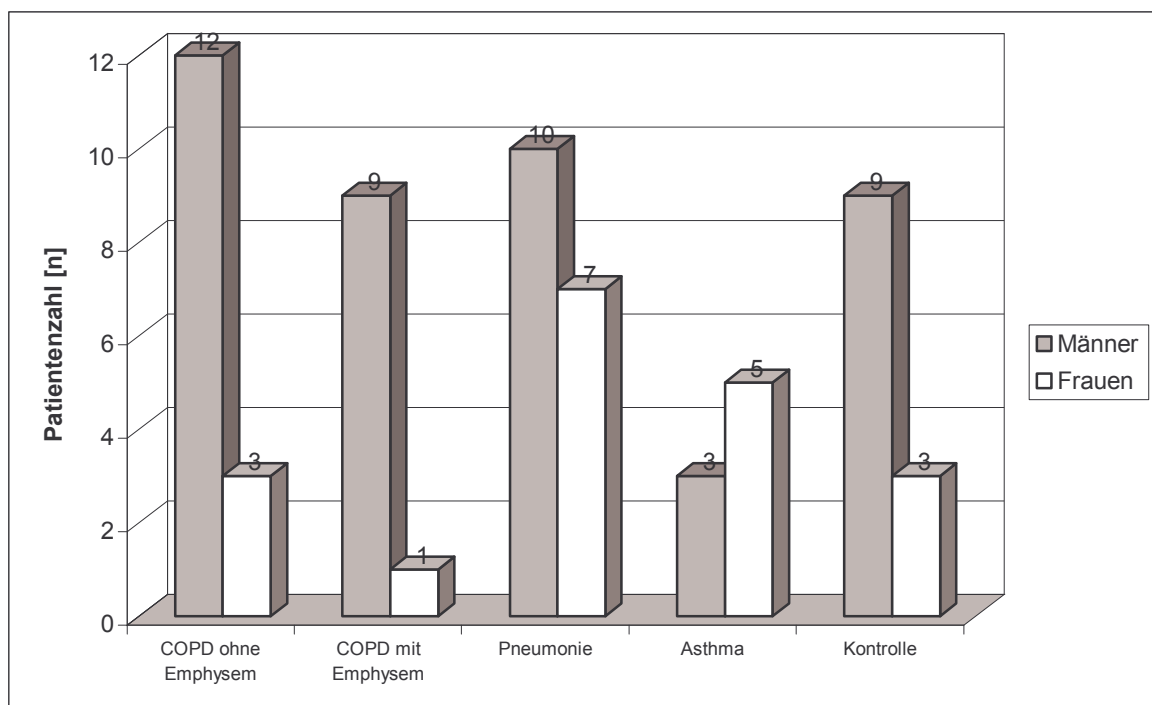
Zur Korrelationsanalyse zwischen zwei Variablen wurde der nichtparametrische Test nach Spearman verwendet. Die Berechnung erfolgte unter Anwendung des Computerprogramms SPSS 10,0 für Windows. Die graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel 2000.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Analyse der untersuchten Patienten

Während des Zeitraums von Anfang November 1997 bis Ende Juli 2000 wurden in der pneumologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller Universität Jena 494 bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt. Davon ließen sich 62 Patienten den zu analysierenden Gruppen (1) COPD ohne Emphysem, (2) COPD mit Emphysem, (3) Pneumonie und (4) leichtem allergischen Asthma bronchiale sowie (5) einer gesunden Kontrollgruppe zuordnen.

Die Gruppe COPD ohne Emphysem bestand aus 15 Patienten, die Gruppe COPD mit Emphysem aus 10 Patienten, die Gruppe Pneumonie aus 17 Patienten, die Asthmagruppe aus 8 Patienten und die gesunde Kontrollgruppe aus 12 Patienten.



**Abbildung 2:** Absolute Verteilung nach Geschlechtern der Patienten mit COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe

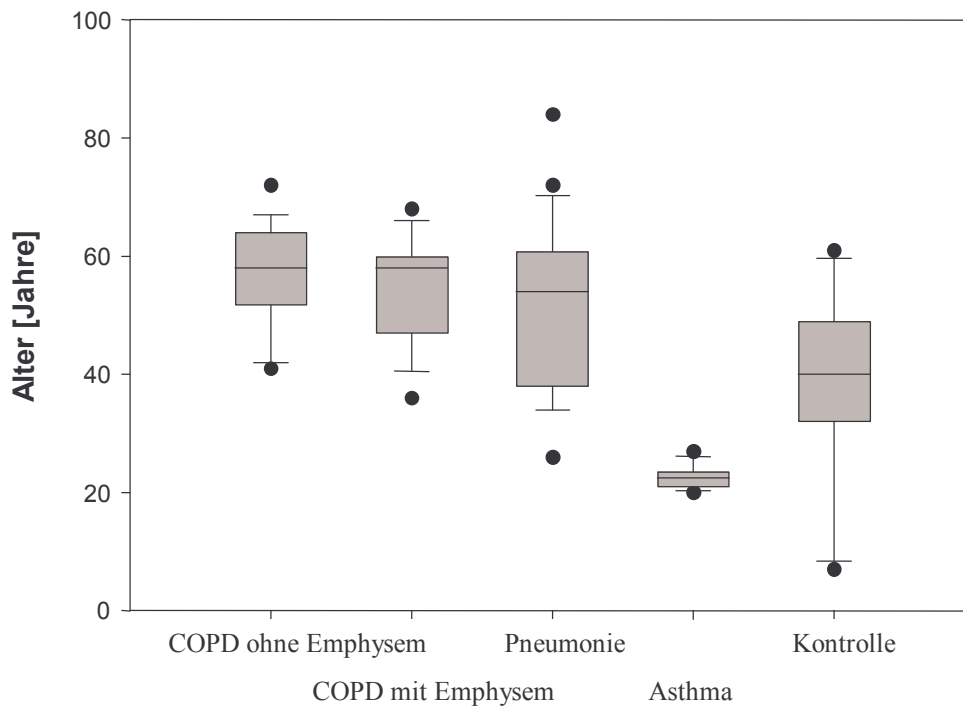
## 5.2 Altersverteilung

Die Einteilung in die jeweilige Patientengruppe erfolgte nach strenger Analyse von Klinik und Zusatzdiagnostik. Dabei war Voraussetzung zur Aufnahme in eine der Vergleichsgruppen, dass bei den jeweiligen Patienten nicht mehrere pneumologische Erkrankungen vorlagen, der Ausschluß einer systemischen Erkrankung sowie das Fehlen einer systemischen Immuntherapie.

Die COPD ist eine Erkrankung, die sich oft erst nach dem 40. Lebensjahr manifestiert (Ullmer und Solèr, 1999). So betrug auch das mediane Alter der hier eingeschlossenen Patienten sowohl in der Gruppe COPD ohne Emphysem als auch in der Gruppe COPD mit Emphysem 58 Jahre. Ferner waren auch die Patienten, bei denen eine Pneumonie diagnostiziert wurde, mit 54 Jahren im ähnlichen Alter. Anders hingegen verhielt es sich bei der gesunden Kontrollgruppe, die sich aus Patienten mit subjektiven Beschwerden zusammensetzte, bei denen jedoch eine pneumologische Erkrankung diagnostisch ausgeschlossen werden konnte. In dieser Gruppe lag das mediane Alter bei 40 Jahren. Die jüngste Gruppe wurde von den Asthmatikern mit einem medianen Alter von 22,5 Jahren gebildet. Bei diesen Patienten handelte es sich in der Mehrzahl um Studenten mit leichtem allergischen Asthma bronchiale (Schweregrad I), die im Rahmen einer Parallelstudie untersucht wurden.

**Tabelle 2: Altersverteilung der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe.** Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

	Median	Maximum	Minimum	n
<b>COPD ohne Emphysem</b>	58	72	41	15
<b>COPD mit Emphysem</b>	58	68	36	10
<b>Pneumonie</b>	54	84	26	17
<b>Asthma</b>	22,5	27	20	8
<b>Kontrolle</b>	40	61	7	12

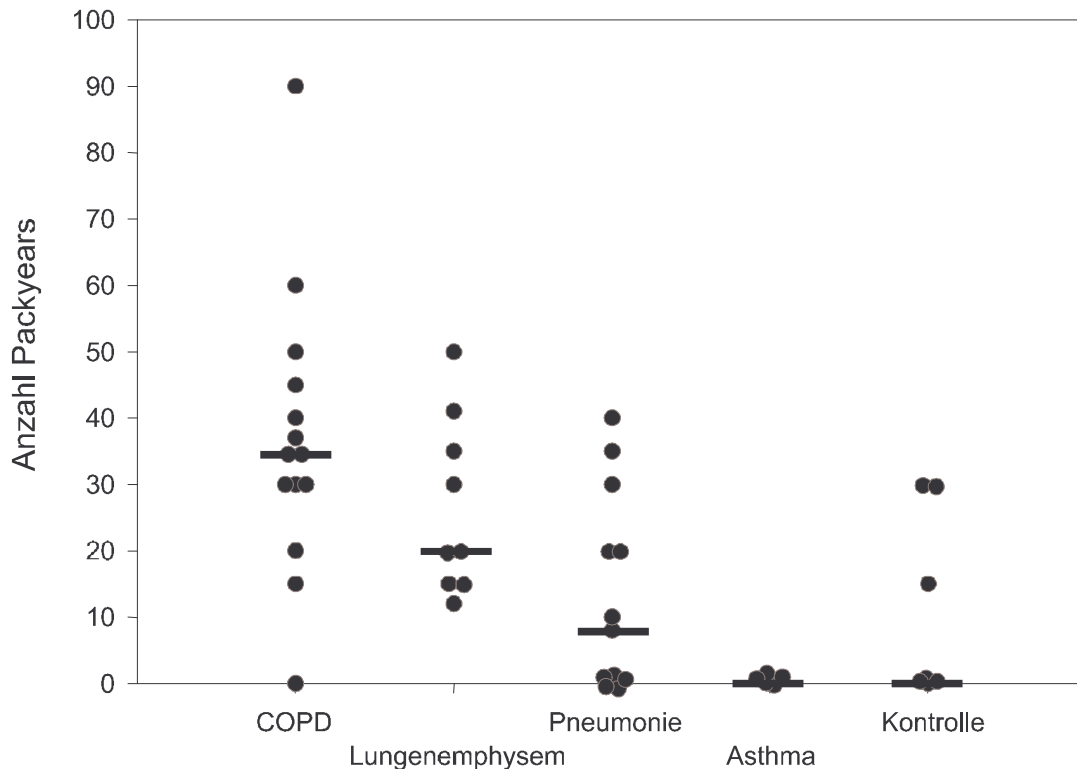


**Abbildung 3:** Altersverteilung der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

### 5.3 Analyse des Rauchverhaltens

Die Hauptursache der COPD ist ein langjähriger Zigarettenkonsum. So fand sich auch in den beiden Gruppen COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem ein hoher Nikotinkonsum. Die größte Exposition betrug 90 packyears (= Packungsjahre; 1 Zigaretenschachtel pro Tag und Jahr = 1 packyear). In der Gruppe COPD mit Emphysem waren alle Patienten Raucher mit einem medianen Zigarettenkonsum von 20 packyears. In der Gruppe COPD ohne Emphysem rauchten 14 von 15 Patienten mit einem medianen Verbrauch von 35 packyears. Damit übertraf die Gruppe COPD ohne Emphysem sogar die Gruppe COPD mit Emphysem. In der Gruppe Pneumonie fanden sich 8 Raucher, ein Exraucher, 6 Nichtraucher und 2 Patienten, bei denen sich ein Nikotinabusus nicht sicher ermitteln ließ. Der mediane Konsum der Patienten dieser Gruppe betrug 8 Jahre. In der gesunden Kontrollgruppe fanden sich 4 Raucher, ein Passivraucher, 4 Nichtraucher und 3 Patienten, bei denen sich ein Nikotinabusus nicht sicher

ermitteln ließ. Der mediane Zigarettenkonsum lag hier bei 0 packyears. Bei der Gruppe Asthma war nur einer der Patienten Raucher.



**Abbildung 4:** Rauchverhalten der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Dargestellt sind die packyears der einzelnen Patienten (Punkte), sofern bekannt, und die Mediane der einzelnen Gruppen (horizontale Striche).

## 5.4 Rückgewinnungsrate („Recovery“) der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) und die Gesamtzellzahl

Nach Inspektion des Bronchialsystems mit einem flexiblen Bronchoskop wurde die BAL durchgeführt. Dazu wurden die vorgegebenen Lungensegmente jeweils mit 5 x 20 ml körperwarmer, physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Die BALF wurde vorsichtig aspiriert und danach das zurückgewonnene Gesamtvolumen bestimmt. Des weiteren wurde die Gesamtzellzahl berechnet.

**Tabelle 3: BALF-Volumen und Gesamtzellzahl der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe.** Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

		Median	Maximum	Minimum	n
<b>BALF-Volumen</b>	<b>COPD ohne Emphysem</b>	50	154	8	15
	<b>COPD mit Emphysem</b>	50	74	23	10
	<b>Pneumonie</b>	50	70	16	17
	<b>Asthma</b>	46	68	25	8
	<b>Kontrolle</b>	58	142	25	12
<b>GZZ</b>	<b>COPD ohne Emphysem</b>	$1,50 \times 10^7$	$8,90 \times 10^7$	$3,00 \times 10^5$	15
	<b>COPD mit Emphysem</b>	$6,20 \times 10^6$	$1,86 \times 10^7$	$1,10 \times 10^6$	10
	<b>Pneumonie</b>	$5,20 \times 10^6$	$1,36 \times 10^8$	$3,00 \times 10^5$	17
	<b>Asthma</b>	$1,03 \times 10^7$	$1,64 \times 10^7$	$1,70 \times 10^6$	8
	<b>Kontrolle</b>	$7,55 \times 10^6$	$4,64 \times 10^7$	$2,80 \times 10^6$	12

Weder im zurückgewonnenen BALF-Volumen noch in der Gesamtzellzahl zeigten sich signifikante Unterschiede bei den verschiedenen Gruppen. Die höchste Gesamtzellzahl fand sich bei den Patienten der Gruppe COPD ohne Emphysem.

## 5.5 Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)

Differentialzytologisch ließen sich bei den verschiedenen Lungenerkrankungen unterschiedliche Zellverteilungsmuster in der BALF nachweisen. Je nach Lungenerkrankung zeigten sich Unterschiede in der prozentualen Verteilung der einzelnen Zelltypen.

Der höchste relative Makrophagenanteil konnte in der Gruppe COPD ohne Emphysem (92,00 %) festgestellt werden, gefolgt von der gesunden Kontrollgruppe (89,75 %) sowie der Gruppe COPD mit Emphysem (88,50 %). Geringer war der relative Makrophagenanteil demgegenüber bei der Gruppe Pneumonie (67,50 %) und der Gruppe Asthma (81,50 %). Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe COPD ohne Emphysem und der Gruppe Pneumonie ( $p=0,001$ ) sowie zwischen der Gruppe COPD ohne Emphysem und der Gruppe Asthma ( $p=0,019$ ). Die gesunde Kontrollgruppe wies

signifikante Unterschiede gegenüber den Gruppen Pneumonie ( $p=0,002$ ) und Asthma ( $p=0,025$ ) auf. Die Gruppe COPD mit Emphysem hatte gegenüber der Gruppe Pneumonie einen signifikant erhöhten Makrophagenanteil ( $p=0,046$ ).

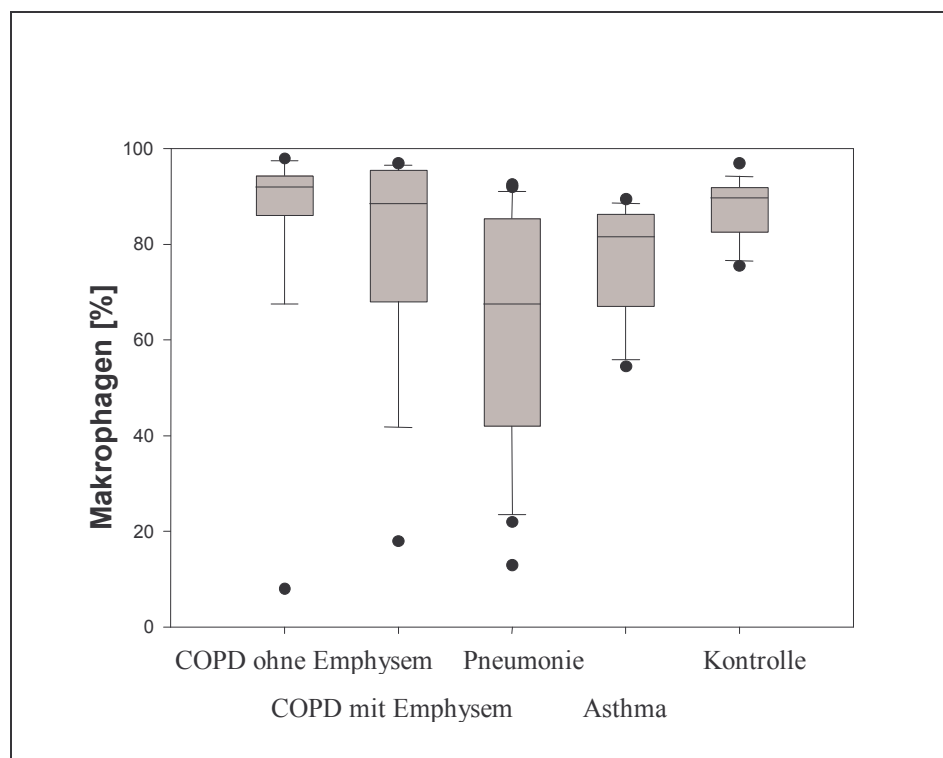
Der höchste Lymphozytenanteil wurde in der Gruppe Asthma (12,30 %) mit signifikanten Unterschieden zur Gruppe COPD mit Emphysem (5,50 %;  $p=0,012$ ) und zur Gruppe COPD ohne Emphysem (5,00 %;  $p=0,004$ ) vorgefunden. Auch bei der Gruppe Pneumonie war der prozentuale Lymphozytenanteil mit 10,00 % relativ hoch mit einem signifikanten Unterschied zur Gruppe COPD ohne Emphysem ( $p=0,04$ ).

Der größte Anteil von neutrophilen Granulozyten fand sich bei der Gruppe Pneumonie (17,00 %) mit signifikanten Unterschieden zur gesunden Kontrollgruppe (1,00 %;  $p=0,008$ ) und zur Gruppe COPD ohne Emphysem (1,00 %;  $p=0,037$ ). Zudem ergab sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den relativen Anteil neutrophiler Granulozyten zwischen der Gruppe COPD mit Emphysem (3,00 %) und der gesunden Kontrollgruppe (1,00 %;  $p=0,009$ ).

Der mediane Anteil der eosinophilen Granulozyten betrug außer bei der Gruppe Asthma bei allen anderen Gruppen 0 %. Bei der Gruppe Asthma fand sich ein relativer Anteil an eosinophilen Granulozyten von 1,80 %. Der relative Anteil an eosinophilen Granulozyten war somit bei der Gruppe Asthma signifikant erhöht gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (1,80 % versus 0,00 %;  $p=0,002$ ) und gegenüber der Gruppe COPD ohne Emphysem (1,80 % versus 0,00 %;  $p=0,047$ ). Ferner ergab sich eine signifikante Tendenz gegenüber der Gruppe COPD mit Emphysem (1,08 % versus 0,00 %;  $p=0,083$ ).

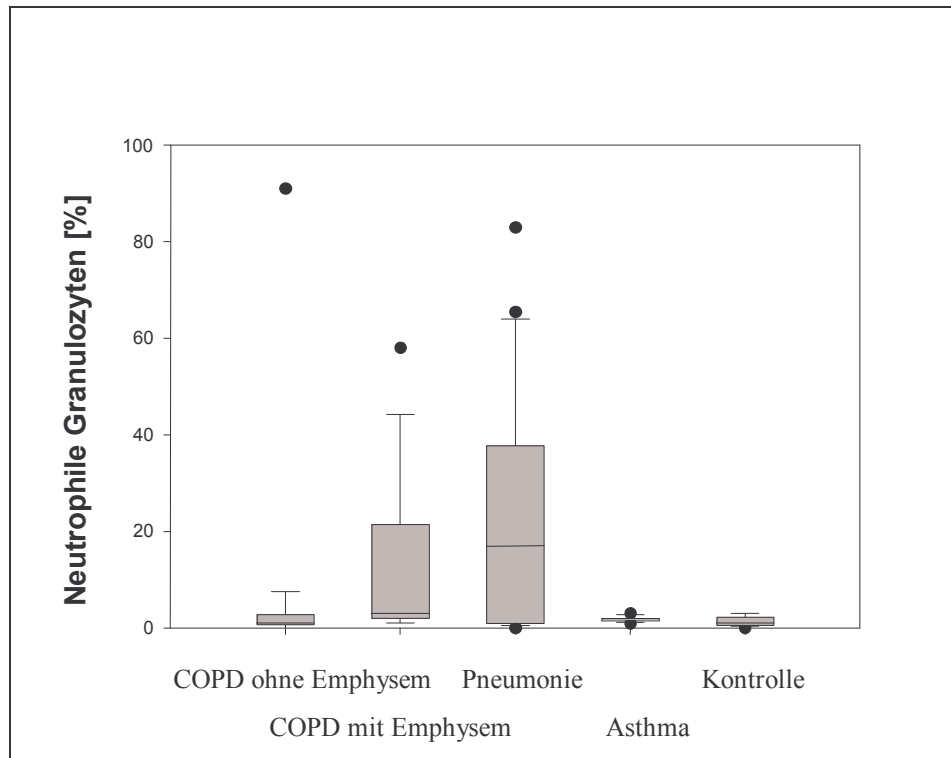
**Tabelle 3:** Differentialzellbild der BALF-Zellen der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

		COPD ohne Emphysem	COPD mit Emphysem	Pneumonie	Asthma	Kontrolle
Makrophagen	Median	92,00%	88,50%	67,50%	81,50%	89,75%
	Maximum	98,00%	97,00%	92,50%	89,50%	97,00%
	Minimum	8,00%	18,00%	13,00%	54,50%	75,50%
	n	15	10	17	8	12
Lymphozyten	Median	5,00%	5,50%	10,00%	12,30%	8,50%
	Maximum	26,00%	18,00%	32,60%	41,50%	23,00%
	Minimum	0,00%	1,00%	0,50%	8,00%	3,00%
	n	15	10	17	8	12
Neutrophile Granulozyten	Median	1,00%	3,00%	17,00%	2,00%	1,00%
	Maximum	91,00%	58,00%	83,00%	3,00%	3,00%
	Minimum	0,00%	1,00%	0,00%	1,00%	0,00%
	n	15	10	17	8	12
Eosinophile Granulozyten	Median	0,00%	0,00%	0,00%	1,80%	0,00%
	Maximum	4,00%	4,00%	19,00%	8,00%	1,00%
	Minimum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	n	15	10	17	8	12

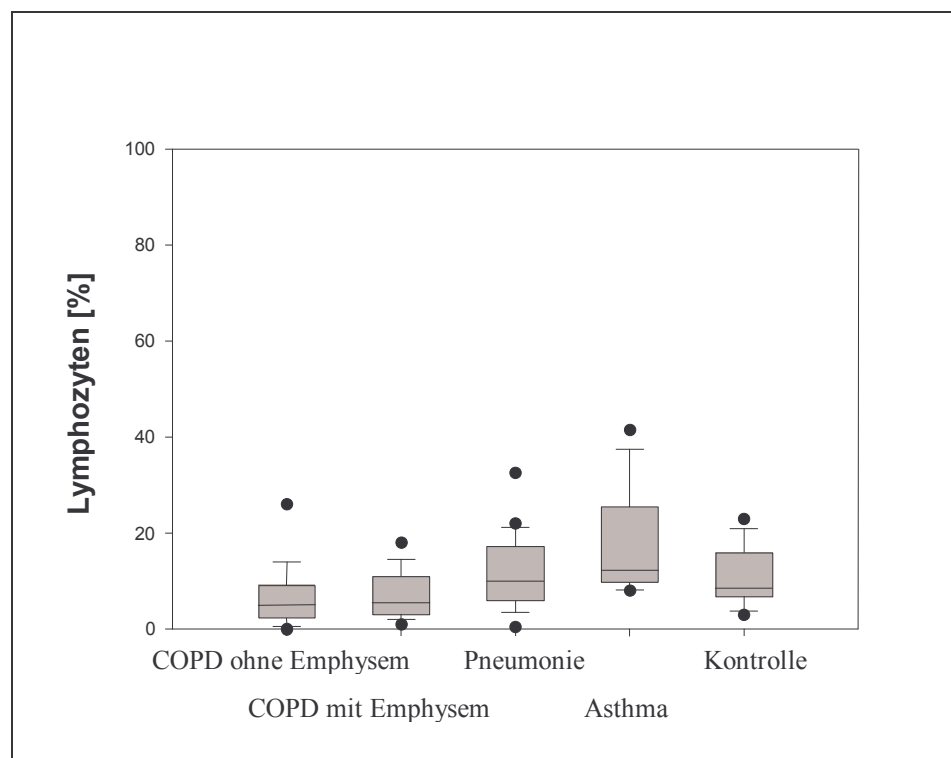


**Abbildung 5:** Relativer Makrophagenanteil bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

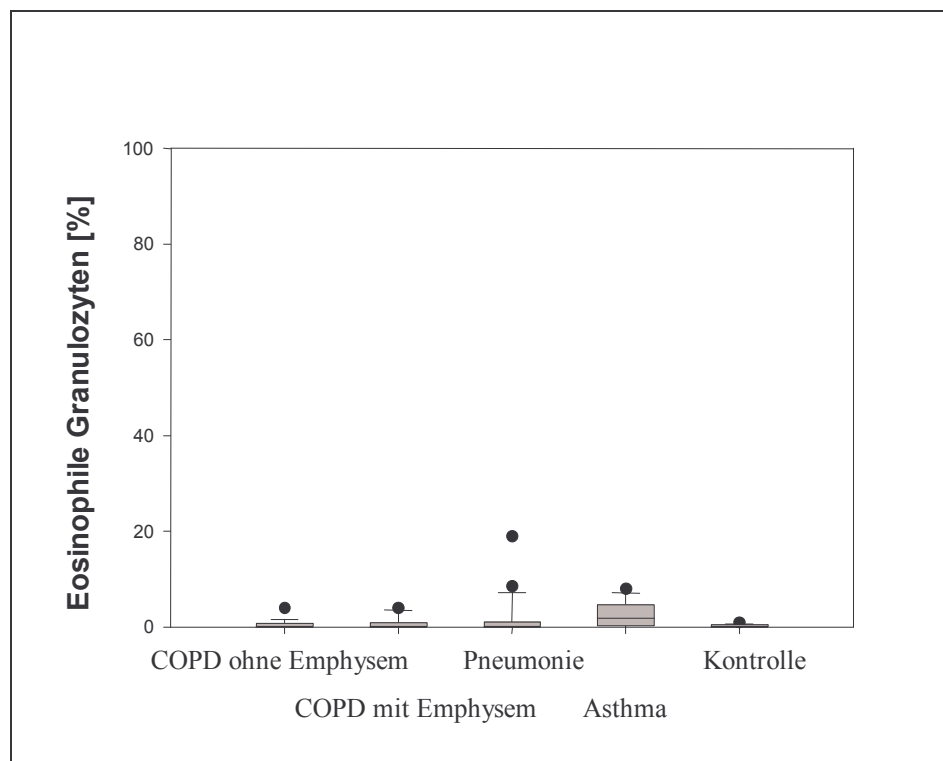




**Abbildung 6:** Relativer Anteil neutrophiler Granulozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 7:** Relativer Anteil an Lymphozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 8:** Relativer Anteil eosinophiler Granulozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

## 5.6 Verteilung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Nach Anfertigung des Differentialzellbildes der BAL wurden die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen der T-Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert. CD3 diente als Marker der Gesamt-T-Lymphozyten. Während CD4 von den T-Helferzellen exprimiert wird, findet sich CD8 auf der Oberfläche von T-Suppressor-Zellen. Es wurde jeweils der relative Anteil CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bezogen auf die Zahl CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bestimmt.

Zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen gab es keine großen Unterschiede in den Subpopulationen der T-Lymphozyten. Zwar fand sich der höchste Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der gesunden Kontrollgruppe (64,6 %) und der niedrigste in der Asthmagruppe (47,4 %), jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Demgegenüber wurde in der Asthmagruppe ein mit 43,7 % vermehrter Anteil CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten vorgefunden. Die geringsten Anteile wurden mit 23,9 % in

der Gruppe Pneumonie und mit 22,35 % in der Gruppe COPD mit Emphysem nachgewiesen. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Pneumonie gegenüber der Gruppe Asthma ( $p=0,008$ ) und eine marginale Signifikanz im Vergleich der Gruppe Pneumonie mit der gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,074$ ), sowie zwischen den Gruppen COPD mit Emphysem und Asthma ( $p=0,055$ ).

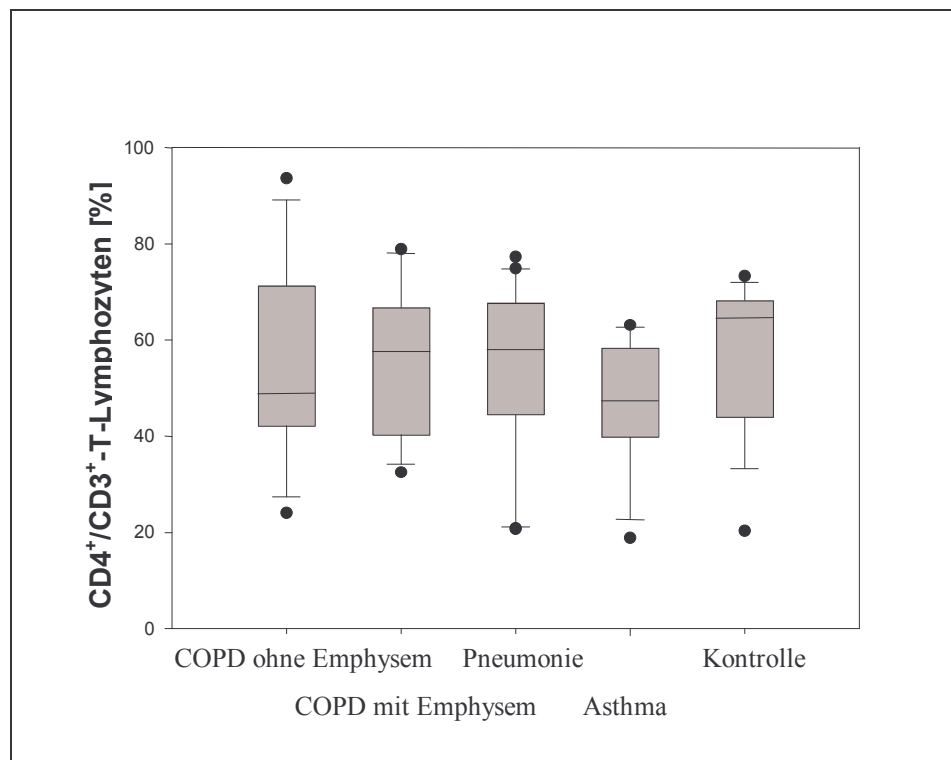
Bei der Analyse der CD4/CD8-Quotienten ergaben sich die höchsten Werte bei der Gruppe COPD mit Emphysem (2,6) und bei der Gruppe Pneumonie (2,4). Generell niedrig war das Verhältnis hingegen bei der Asthmagruppe (1,1) und der Gruppe COPD ohne Emphysem (1,18). Der Vergleich des CD4/CD8-Quotienten der einzelnen Erkrankungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Pneumonie- und der Asthmagruppe ( $p=0,018$ ).

**Tabelle 4:** Relative Anteile CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen an CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

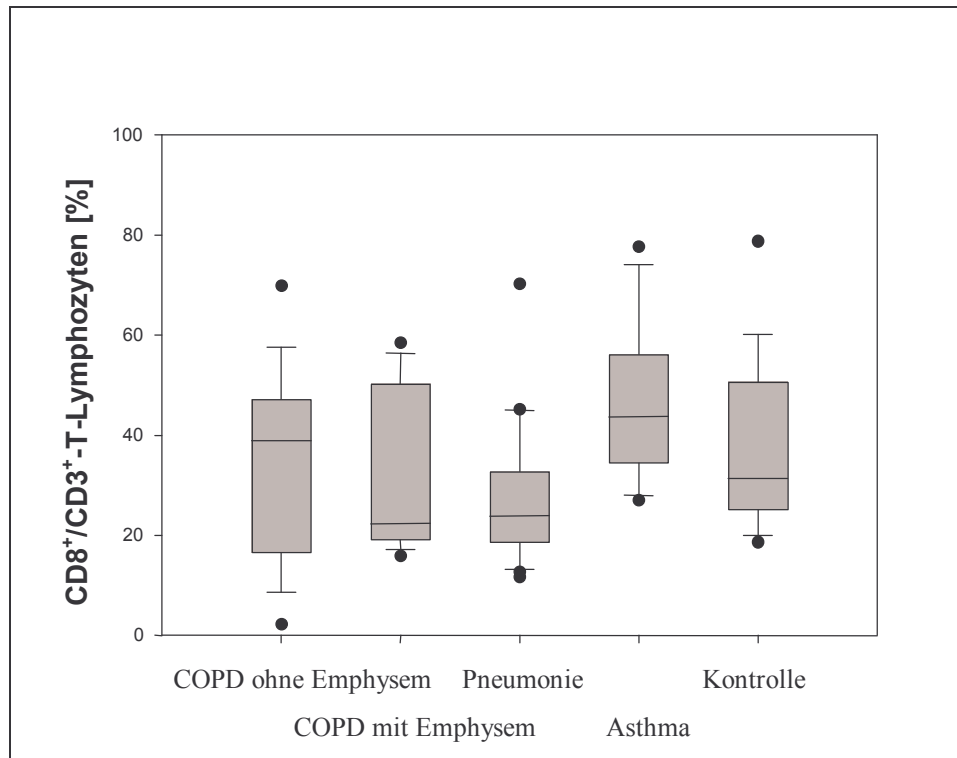
		COPD ohne Emphysem	COPD mit Emphysem	Pneumonie	Asthma	Kontrolle
CD4/CD3	Median	48,90%	57,65%	58,05%	47,40%	64,60%
	Maximum	93,70%	79,00%	77,40%	63,20%	73,40%
	Minimum	24,20%	32,60%	20,80%	18,90%	20,40%
	n	15	10	16	7	12
CD8/CD3	Median	38,90%	22,35%	23,90%	43,70%	31,35%
	Maximum	69,90%	58,50%	70,30%	77,70%	78,80%
	Minimum	2,30%	16,00%	11,70%	27,10%	18,70%
	n	15	10	16	7	12

**Tabelle 5:** Verhältnis an  $CD4^+/CD3^+$ -T-Lymphozyten zu  $CD8^+/CD3^+$ -T-Lymphozyten der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

	COPD ohne Emphysem	COPD mit Emphysem	Pneumonie	Asthma	Kontrolle
<b>Median</b>	1,18	2,61	2,43	1,08	2,06
<b>Maximum</b>	40,74	4,82	4,83	2,33	3,93
<b>Minimum</b>	0,00	0,61	0,30	0,24	0,26
<b>n</b>	15	10	16	7	12



**Abbildung 9:** Relativer Anteil der  $CD4^+$ -Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der  $CD3^+$ -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 10:** Relativer Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

## 5.7 Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten

Das CD25-Antigen, welches auch IL-2-Rezeptor genannt wird, ist ein Marker der akuten zellulären Aktivierung. Demgegenüber werden die Antigene HLA-DR und VLA-1 im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge exprimiert (Kroegel et al., 1995).

Um den Aktivierungsgrad der bronchoalveolären CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu analysieren, wurden diese drei Antigene auf den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bestimmt. Nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD25, HLA-DR und VLA-1 erfolgte die Messung. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

**Tabelle 6:** Relativer Anteil der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

		COPD ohne Emphysem	COPD mit Emphysem	Pneumonie	Asthma	Kontrolle
CD25/CD4	Median	15,15%	16,30%	9,15%	14,80%	12,60%
	Maximum	35,30%	30,30%	34,40%	18,40%	27,00%
	Minimum	8,10%	2,20%	2,30%	7,10%	2,80%
	n	14	10	16	7	12
HLA-DR/CD4	Median	6,60%	5,70%	4,55%	2,70%	2,90%
	Maximum	22,20%	48,10%	96,30%	5,00%	6,50%
	Minimum	0,00%	3,50%	0,20%	0,20%	0,40%
	n	11	9	12	7	9
VLA-1/CD4	Median	39,70%	39,15%	25,20%	17,90%	18,25%
	Maximum	59,90%	75,00%	51,50%	31,00%	39,10%
	Minimum	2,40%	9,00%	6,30%	4,60%	8,40%
	n	10	6	10	7	8
CD25/CD8	Median	1,30%	2,40%	0,60%	1,30%	1,20%
	Maximum	9,00%	8,90%	25,80%	7,40%	2,70%
	Minimum	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	n	14	9	14	7	12
HLA-DR/CD8	Median	4,00%	4,90%	1,85%	2,50%	2,90%
	Maximum	9,20%	16,00%	26,90%	7,10%	22,00%
	Minimum	0,60%	0,30%	0,00%	0,50%	0,10%
	n	11	9	12	7	9
VLA-1/CD8	Median	42,25%	52,30%	69,65%	64,40%	56,00%
	Maximum	94,20%	77,50%	86,90%	86,10%	74,80%
	Minimum	9,20%	9,10%	13,00%	9,60%	4,73%
	n	10	9	10	7	9

Die Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR wurden von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten stärker exprimiert als von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Bei der Expression von CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ergaben sich bei der Gruppe COPD ohne Emphysem mit 15,15 % und der Gruppe COPD mit Emphysem mit 16,30 % sowie der Gruppe

Asthma (14,80 %) höhere Werte im Vergleich zu der Gruppe Pneumonie (9,15 %) und der gesunden Kontrollgruppe (12,60 %).

Bei den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde eine geringere Expression des Aktivierungsmarkers CD25 im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt. Hier reichten die Werte von 0,60 % bei der Gruppe Pneumonie bis 2,40 % bei der Gruppe COPD mit Emphysem. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen.

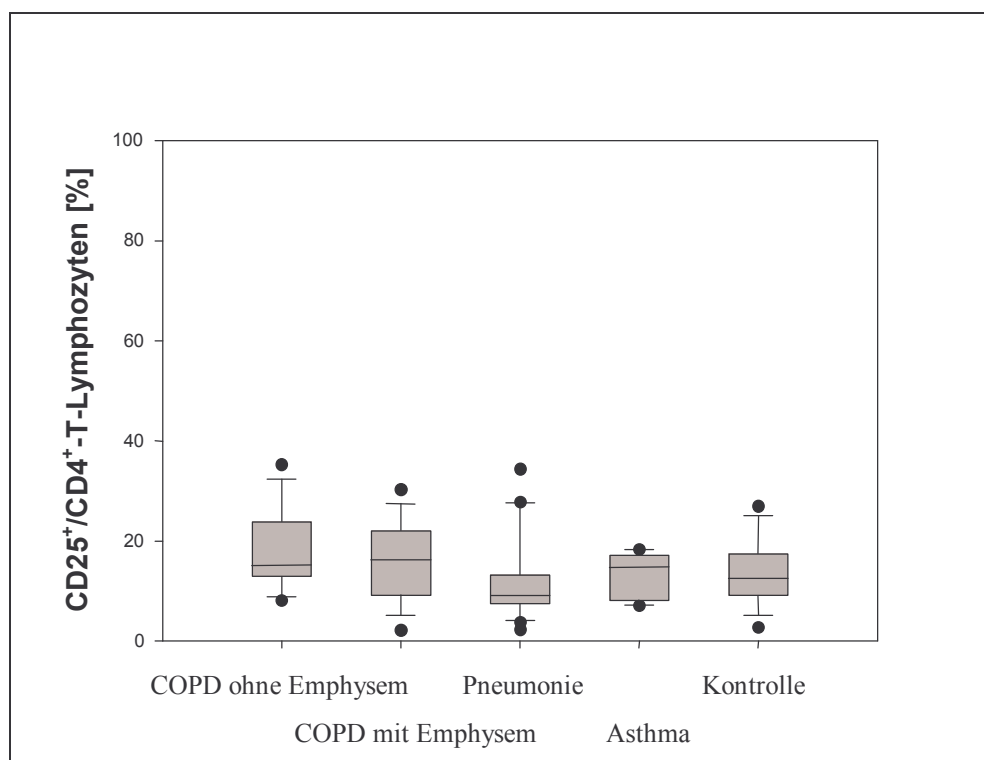
Die Expression des Oberflächenantigens HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten war in der Gruppe COPD ohne Emphysem (6,60 %) am deutlichsten. Dagegen war HLA-DR bei der Asthmagruppe und bei der gesunden Kontrollgruppe auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nur in geringem Maße nachweisbar (2,70 % bzw. 2,90 %). Im Vergleich der Gruppe COPD mit Emphysem (5,70 % versus 2,90 %) zeigte sich zur gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied ( $p=0,011$ ). Ein signifikanter Unterschied konnte zudem im Vergleich der Gruppe COPD mit Emphysem zur Asthmagruppe festgestellt werden (5,70 % versus 2,70 %;  $p=0,016$ ).

Im Gegensatz dazu ergaben sich beim Expressionsverhalten von HLA-DR auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Vergleichsgruppen. Dabei wurde HLA-DR auf den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Gruppe COPD mit Emphysem (4,90 %) und der Gruppe COPD ohne Emphysem (4,00 %) am deutlichsten exprimiert.

Der sehr späte Aktivierungsmarker VLA-1 zeigte bei den verschiedenen Vergleichsgruppen ein unterschiedliches Expressionsverhalten auf den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Während VLA-1 auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Gruppe COPD ohne Emphysem (39,70 %) und der Gruppe COPD mit Emphysem (39,15 %) etwa 15-20 % stärker als bei Asthmagruppe (17,90 %), der Pneumoniegruppe (25,20 %) und der gesunden Kontrollgruppe (18,25 %) exprimiert wurde, zeigte sich auf den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein umgekehrtes Expressionsmuster. Hier wurde der Aktivierungsmarker VLA-1 stärker von der Pneumoniegruppe (69,65 %), der Asthmagruppe (64,40 %) und der gesunden Kontrollgruppe (56,00 %) als von der Gruppe COPD ohne Emphysem (42,25 %) und der Gruppe COPD mit Emphysem (52,30 %) exprimiert. Es ließen sich jedoch

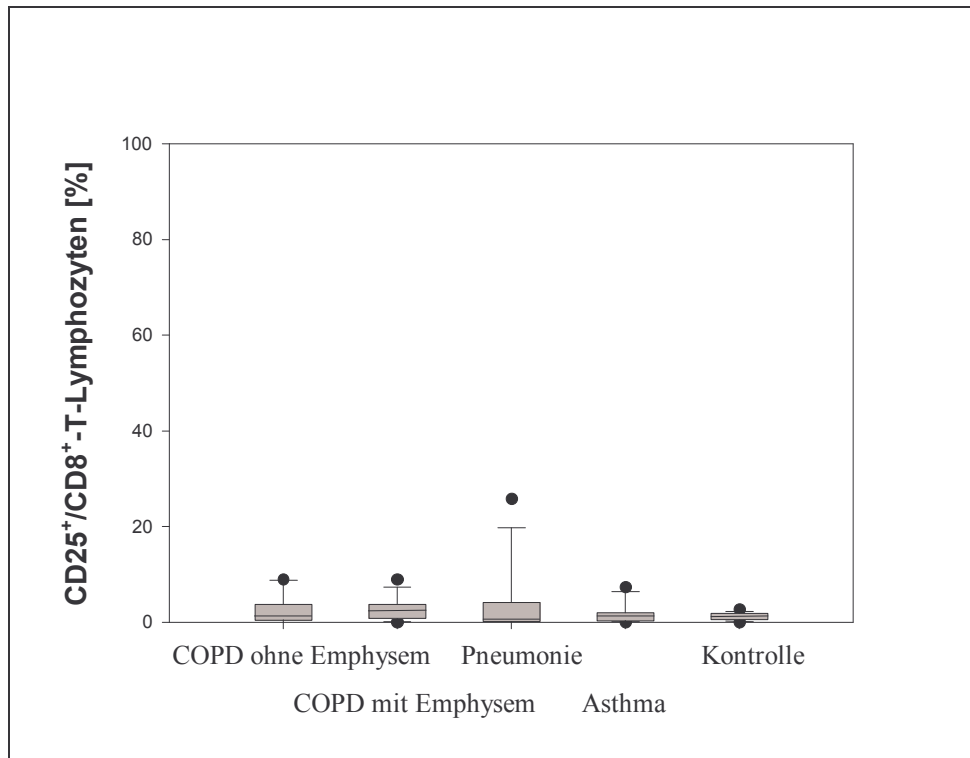
weder im Expressionsverhalten von VLA-1 auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten noch auf den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten signifikante Unterschiede nachweisen.

Im Ergebnis konnte ein Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen bei der Expression der beiden Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR nur auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt werden. Demgegenüber wurden die beiden Aktivierungsmarker CD 25 und HLA-DR ohne wesentliche Varianz zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen von den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nur in geringerem Maß exprimiert.

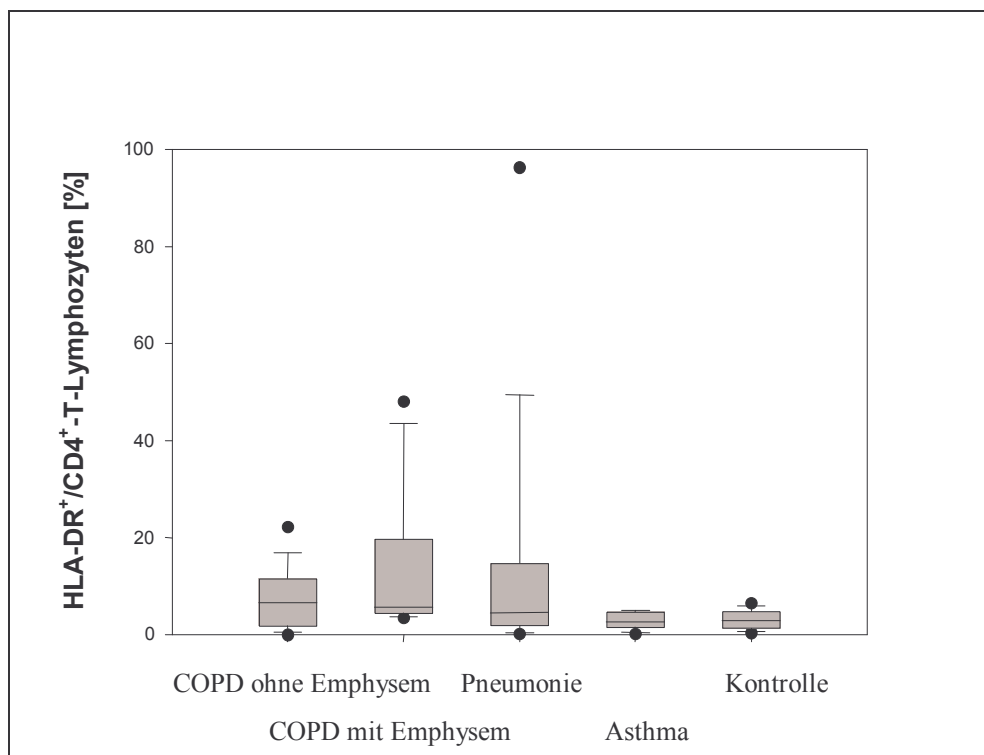


**Abbildung 11:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

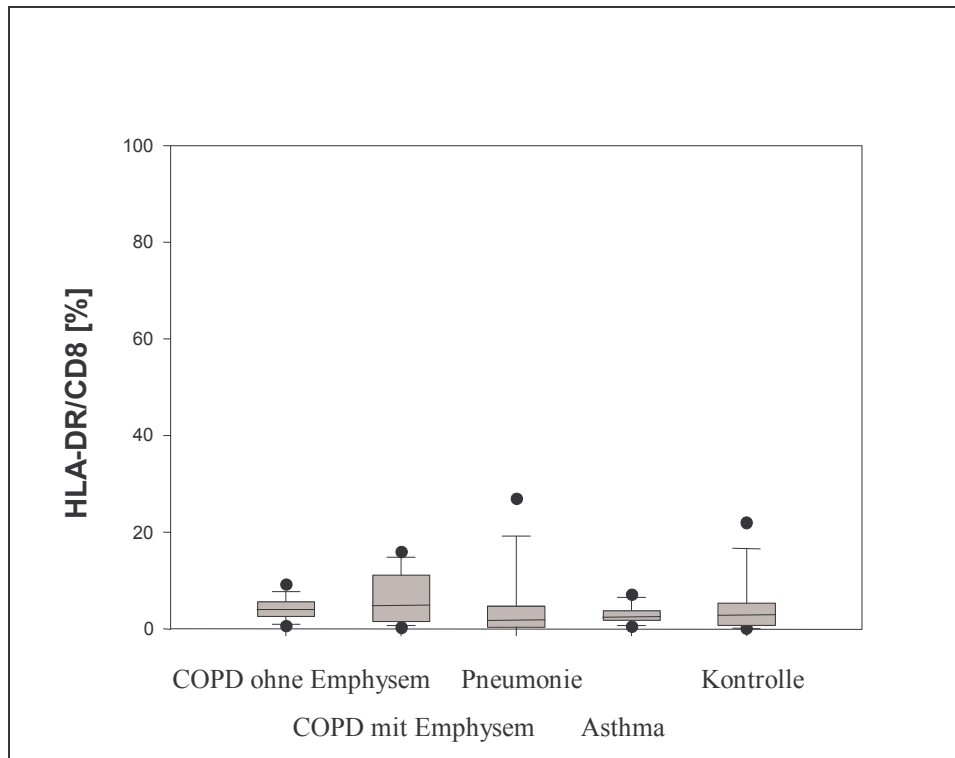




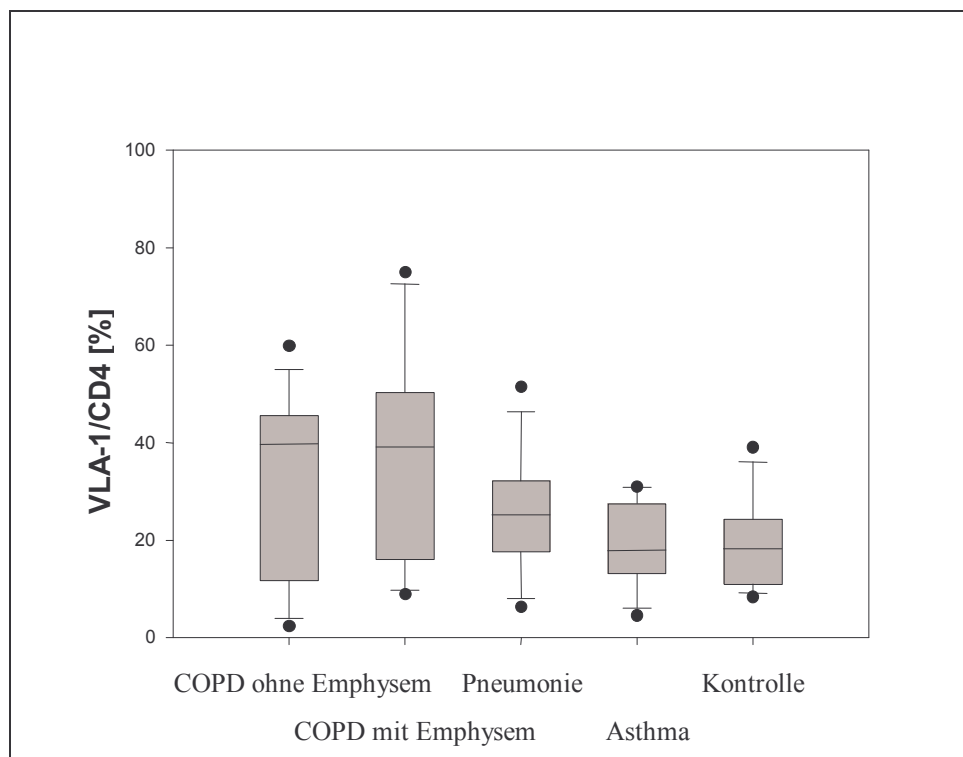
**Abbildung 12:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



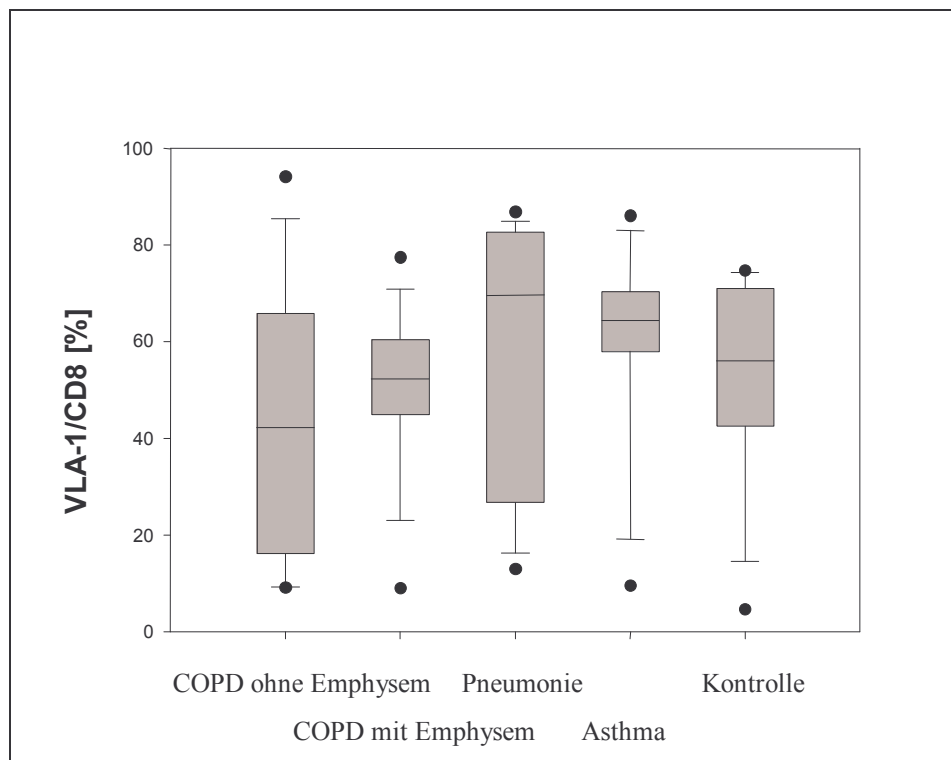
**Abbildung 13:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 14:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 15:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 16:** Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

## 5.8 Expression von $\alpha^E\beta_7$ auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Lymphozyten

Fibrotische Lungenerkrankungen gehen bekanntermaßen mit einer erhöhten Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten einher (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999).

Bei der COPD treten ebenfalls strukturelle Veränderungen beziehungsweise ein Gewebsumbau auf, welches sich unter anderem in einer peribronchialen Fibrose äußert (Bosken et al., 1990). Beim Emphysem ist die Destruktion der Alveolarwände ein charakteristisches Merkmal. Dabei kommt es in den emphysematösen Gebieten durch Reparaturmechanismen und Remodeling zur Synthese eines fibrotischen Gewebes, welches sich aus Elastin und Kollagen zusammensetzt (Vlahovic et al., 1999). Daher stellt sich die Frage, ob sich durch eine Analyse des Expressionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF von Patienten mit einer COPD je nach Schwere der Erkrankung

verschiedene Expressionsmuster nachweisen lassen. Aus diesem Grund wurde das Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit COPD ohne Emphysem und bei Patienten mit COPD mit Emphysem analysiert. Diese Werte wurden zusätzlich mit denen von Patienten mit Pneumonie, Patienten mit Asthma sowie einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Darüber hinaus wurde das Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD8^+$ -T-Lymphozyten untersucht.

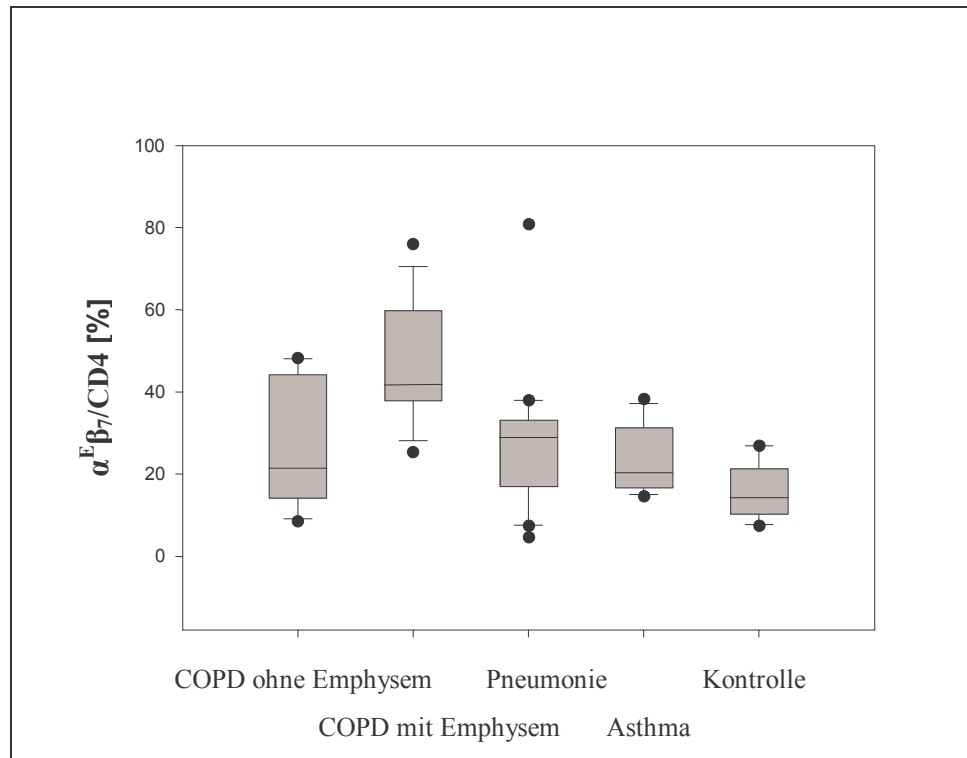
Die Bestimmung des Expressionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten erfolgte durchflußzytometrisch nach Markierung der BAL-Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD4, CD8 und  $\alpha^E\beta_7$ .

**Tabelle 7: Relativer Anteil von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe.** Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

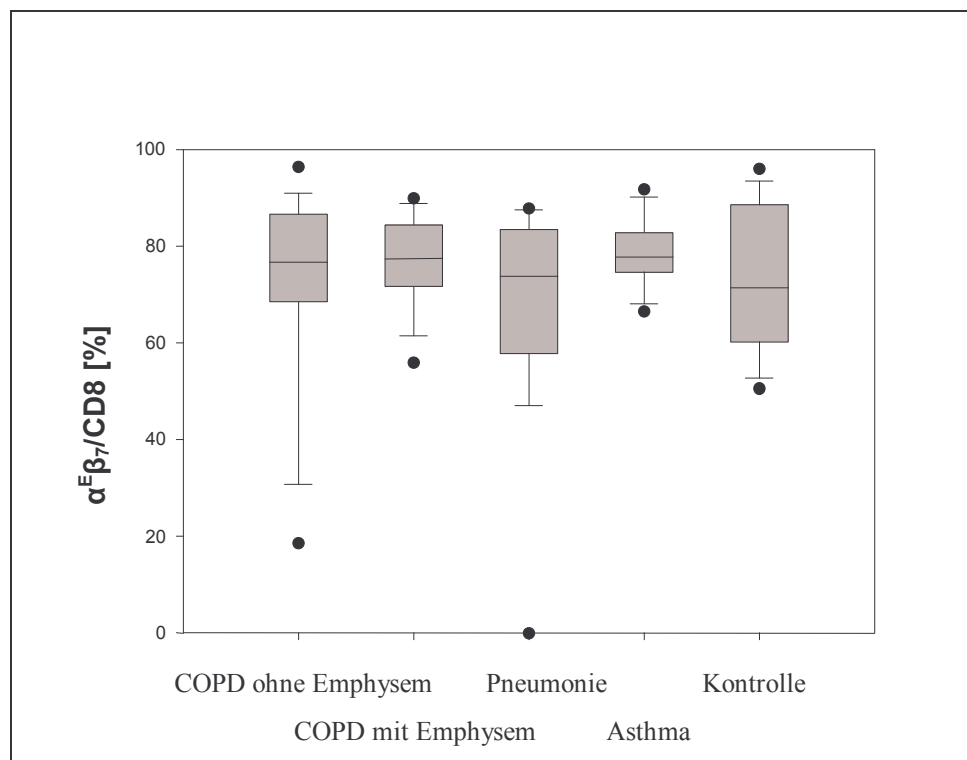
		COPD ohne Emphysem	COPD mit Emphysem	Pneumonie	Asthma	Kontrolle
$\alpha^E\beta_7/CD4$	Median	21,50	41,80%	28,95%	20,40%	14,30%
	Maximum	48,30%	76,00%	80,90%	38,40%	27,00%
	Minimum	8,50%	25,40%	4,60%	14,70%	7,50%
	n	15	10	16	7	12
$\alpha^E\beta_7/CD8$	Median	76,70%	77,40%	73,75%	77,70%	71,40%
	Maximum	96,40%	89,90%	87,80%	91,80%	96,00%
	Minimum	18,60%	56,00%	0,00%	66,50%	50,60%
	n	15	9	14	7	12

Die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten lag bei Patienten der Gruppe COPD mit Emphysem (41,80 %) signifikant höher als bei den Patienten der Gruppen COPD ohne Emphysem (21,50 %;  $p=0,031$ ), Asthma (20,40 %;  $p=0,003$ ), Pneumonie (28,95 %;  $p=0,002$ ) und der gesunden Kontrollgruppe (14,30 %;  $p<0,001$ ). Des weiteren wurde bei den Patienten der Gruppe Pneumonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten ( $p=0,026$ ) festgestellt.

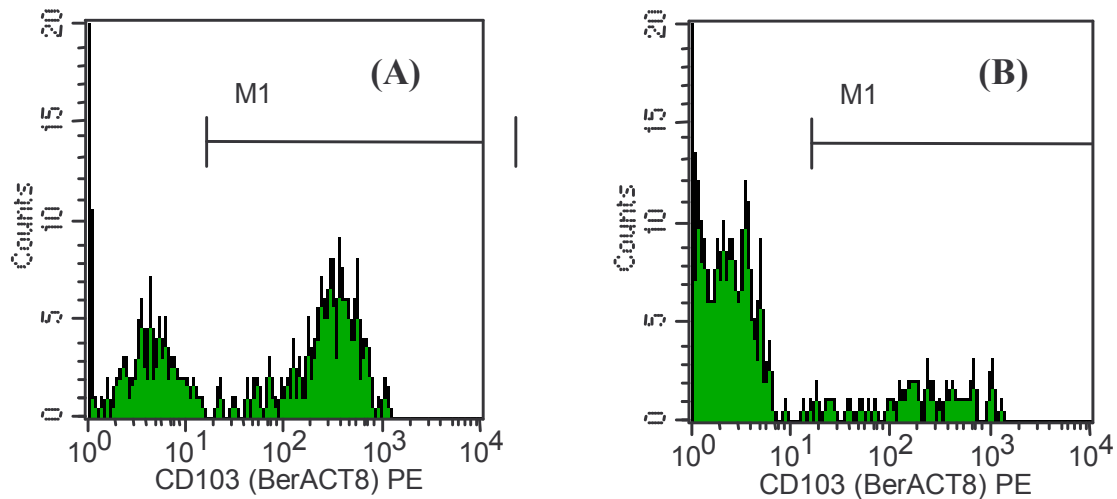
Demgegenüber wurde bei allen Gruppen eine relativ gleich hohe Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $CD8^+$ -T-Lymphozyten (71,40-77,70 %) nachgewiesen.



**Abbildung 17:** Intensität der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.



**Abbildung 18:** Intensität der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $CD8^+$ -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.

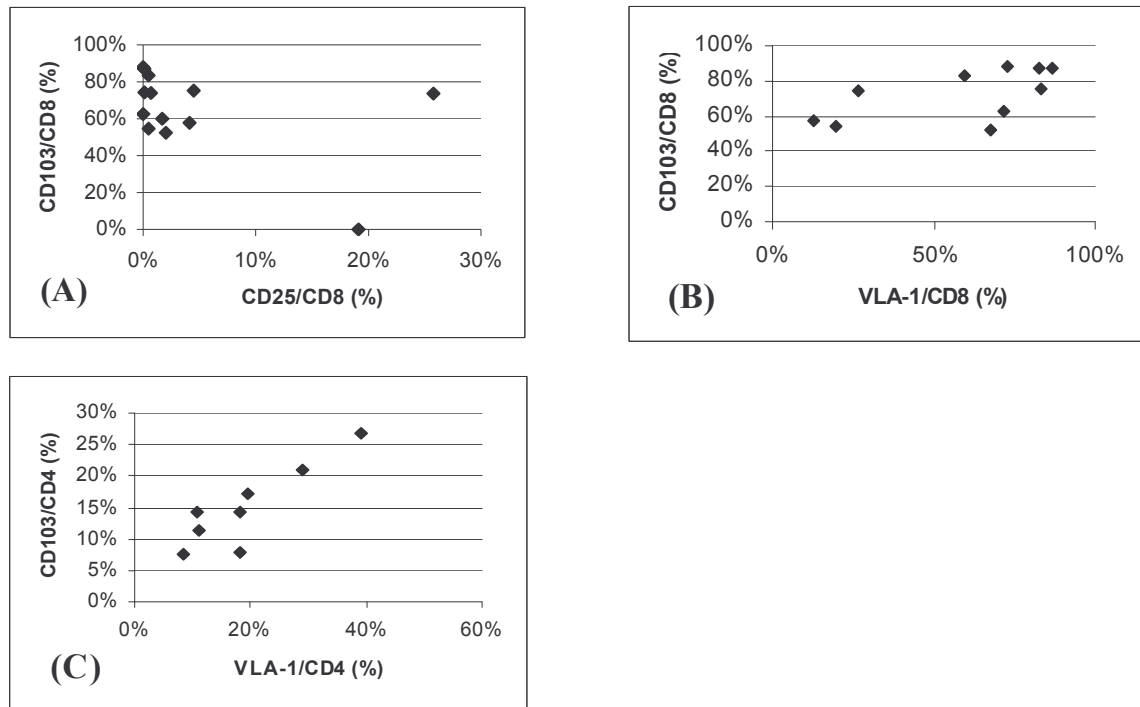


**Abbildung 19:** Histogramme der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bei einem Patienten mit COPD und Emphysem mit 59,9 %  $\alpha^E\beta_7/CD4^+$ -T-Lymphozyten (A) und einer gesunden Kontrolle mit 11,5 %  $\alpha^E\beta_7/CD4^+$ -T-Lymphozyten (B). Die Daten eines repräsentativen Patienten aus der jeweiligen Gruppe sind dargestellt.

## 5.9 Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7$ zu den Aktivierungsmarkern CD25, HLA-DR und VLA-1

Zudem stellt sich die Frage, ob die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  mit der Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 korreliert, da  $\alpha^E\beta_7$  ebenfalls als Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten beschrieben wurde (Rihs et al., 1996).

Hierzu wurde die Korrelation zwischen der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression und der Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf den  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Lymphozyten bei den verschiedenen Gruppen analysiert. Dabei zeigte sich bei der Gruppe Pneumonie eine Korrelation zwischen der  $\alpha^E\beta_7$ - und der CD25-Expression (Korrelationskoeffizient=-0,584;  $p=0,028$ ) sowie eine Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf den  $CD8^+$ -T-Lymphozyten (Korrelationskoeffizient=0,636;  $p=0,048$ ). Ferner ergab sich bei der gesunden Kontrollgruppe eine Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf den  $CD4^+$ -T-Lymphozyten (Korrelationskoeffizient=0,874;  $p=0,005$ ).

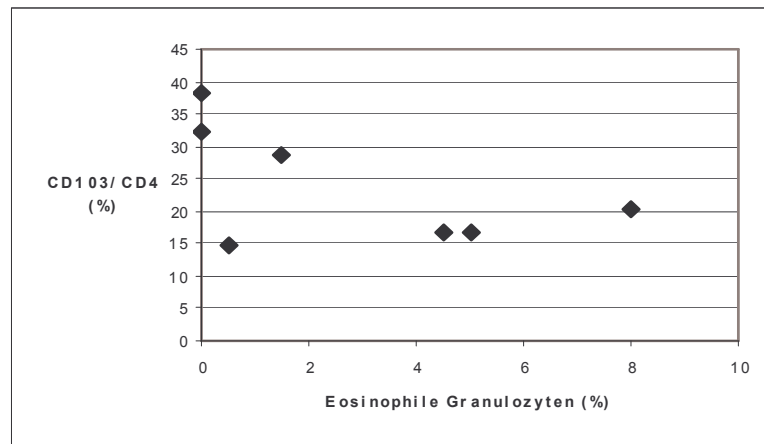


**Abbildung 20:** Korrelation zwischen  $\alpha^E\beta_7$  und CD25 auf  $CD8^+$ -T-Lymphozyten bei der Gruppe Pneumonie (A); Korrelation zwischen  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf  $CD8^+$ -T-Lymphozyten bei der Gruppe Pneumonie (B); Korrelation zwischen  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf  $CD4^+$ -T-Lymphozyten bei der gesunden Kontrollgruppe (C).

## 5.10 Beziehung zwischen den $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und der relativen Zahl eosinophiler Granulozyten in der BALF bei allergischem Asthma bronchiale

Patienten mit einem allergischen Asthma bronchiale, die eine hohe Anzahl  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierende  $CD4^+$ -T-Lymphozyten haben, weisen eine deutliche BAL-Eosinophilie auf (Rihs et al., 1996). Daher stellte sich die Frage, ob bei den hier untersuchten Patienten mit einem leichten allergischen Asthma bronchiale (Schweregrad I) eine Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dem relativen Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BALF besteht.

Bei den Patienten mit den höchsten Anteilen  $\alpha^E\beta_7$ -exprimierender  $CD4^+$ -T-Lymphozyten (38,40 % bzw. 32,30 %) aus der Gruppe Asthma betrug jedoch der relative Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BALF 0 %. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dem relativen Anteil eosinophiler Granulozyten in der BALF feststellen.



**Abbildung 21:** Beziehung zwischen der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/CD4^+$ T-Lymphozyten und des relativen Anteils eosinophiler Granulozyten in der BALF von Patienten mit leichtem Asthma bronchiale (Schweregrad I).



## 6 Diskussion

Die Arbeit beschäftigt sich mit der durchflußzytometrischen Analyse der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei den Lungenerkrankungen (1) COPD ohne Emphysem, (2) COPD mit Emphysem, (3) Pneumonie, (4) Asthma sowie (5) bei einer gesunden Kontrollgruppe.

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Lungenerkrankungen, welche mit fibrotischen Lungenstrukturveränderungen einhergehen, eine erhöhte Anzahl bronchoalveolärer  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in der BALF vorliegt. Da es auch im Krankheitsverlauf der COPD zu fibrotischen Umbauprozessen in der Lunge kommt, wird in dieser Arbeit das Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten im Hinblick auf die verschiedenen Krankheitsstadien der COPD untersucht und mit den Lungenerkrankungen Pneumonie und Asthma bronchiale sowie mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Bei der durchflußzytometrischen Analyse der BALF von Patienten mit COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und einer gesunden Kontrollgruppe zeigten sich bei der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten krankheitsabhängige Unterschiede. So war die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit COPD mit Emphysem (41,80 %) gegenüber Patienten mit COPD ohne Emphysem (21,50 %;  $p=0,031$ ), Asthma (20,40 %;  $p=0,003$ ), Pneumonie (28,95 %;  $p=0,002$ ) und einer gesunden Kontrollgruppe (14,30 %;  $p<0,001$ ) signifikant erhöht.

Daher stellt sich die Frage, ob  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten am Gewebeumbau zum Emphysem beteiligt sind oder ob es sich hierbei lediglich um ein Epiphänomen handelt.

### 6.1 Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis (COPD)

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung der COPD ist Zigarettenrauchen. Dabei ist der Umfang der Schädigung der Lunge bzw. die Schwere der Erkrankung einerseits vom Umfang des Zigarettenkonsums (Anzahl der

gerauchten Zigaretten und Dauer des Nikotinkonsums) und andererseits von individuellen Faktoren abhängig.

Vor diesem Hintergrund entwickelt sich das Spektrum der COPD von der einfachen chronischen Bronchitis (chronischer Husten und Auswurf) über die chronisch obstruktive Bronchitis (chronischer Husten, Auswurf und Atemwegsobstruktion) bis hin zur chronisch obstruktiven Bronchitis mit Emphysem (zusätzliche Zerstörung des Lungenparenchyms).

Obwohl nicht jeder Raucher ein Emphysem oder eine chronische Obstruktion entwickelt (Saetta et al., 2001), haben nahezu alle Raucher eine chronische Bronchitis.

Der Nikotinkonsum bei den hier untersuchten Patienten mit COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem war überdurchschnittlich hoch. 14 von 15 Patienten mit COPD ohne Emphysem rauchten. Der mediane Nikotinabusus betrug in dieser Gruppe 35 packyears. In der Gruppe COPD mit Emphysem rauchten alle 10 Patienten und der mediane Nikotinkonsum betrug 20 packyears. Damit war der Nikotinkonsum der Patienten mit COPD mit Emphysem im Durchschnitt geringer als der Nikotinkonsum der Patienten mit COPD ohne Emphysem (20 packyears versus 35 packyears). Dies legt die Vermutung nahe, dass bei den Patienten mit COPD mit Emphysem weitere prädisponierende Faktoren eine Rolle spielen. Dafür spricht auch, dass Zigarettenrauchen zwar der wichtigste Risikofaktor ist, jedoch nur ein Teil der Raucher das Vollbild der Erkrankung entwickelt.

## **6.2 Pathogenese und Folgen von fibrotischen Lungenstrukturveränderungen bei der COPD ohne Emphysem und der COPD mit Emphysem**

Wie bereits festgestellt, tritt bei der COPD mit Emphysem wie bei anderen Lungenerkrankungen (z.B. idiopathische pulmonale Fibrose, Sarkoidose und exogen allergische Alveolitis), welche von fibrotischen Lungenstrukturveränderungen begleitet werden, eine erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in der BALF auf. Hierbei stellt sich die Frage, welches Ausmaß die fibrotischen Lungenstrukturveränderungen bei der COPD mit

Emphysem annehmen und welche Faktoren für diese Veränderungen verantwortlich sind.

Im Folgenden soll die Pathogenese von fibrotischen Lungenveränderungen anhand der idiopathischen pulmonalen Fibrose dargestellt werden, da diese Lungenerkrankung wissenschaftlich sehr gut untersucht wurde. Bei der Pathogenese der idiopathischen pulmonalen Fibrose sind vorrangig Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten beteiligt. Die Stimulierung der Alveolarmakrophagen erfolgt vermutlich durch Immunkomplexe. Die so aktivierten Alveolarmakrophagen sezernieren chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten, wie beispielsweise IL-8 und LTB<sub>4</sub>, wodurch neutrophile Granulozyten aus dem Blut in die Alveolen wandern (Hunninghake et al., 1981; Carr et al., 1991; Lynch et al., 1992; Ozaki et al., 1992; Costabel, 1994). Die neutrophilen Granulozyten destruieren das Lungenparenchym durch eine vermehrte Freisetzung von Proteasen und durch eine gesteigerte Produktion von Oxidantien (Cantin et al., 1987; Costabel, 1994). Daraufhin kommt es zu Reperaturvorgängen, bei denen aktivierte Makrophagen Fibroblasten zur Proliferation und Kollagensynthese anregen (Costabel, 1994). Dies führt zu irreversiblen fibrotischen Umbauprozessen.

Dieser Vorgang scheint auch für die fibrotischen Veränderungen bei der COPD und dem Emphysem verantwortlich zu sein. Die Aktivierung der Alveolarmakrophagen erfolgt hier jedoch in erster Linie durch Zigarettenkonsum. Bereits bei jungen Rauchern sind die Atemwegswände von Entzündungszellen infiltriert, obwohl hier noch keine nennenswerte Gewebeentzündung und Fibrose vorliegen. Diese Schädigungen sind noch weitgehend reversibel (Niewoehner et al., 1974). Dieses Krankheitsstadium wird als chronische Bronchitis bezeichnet. Ein Nikotinkonsum über einen längeren Zeitraum führt jedoch zur einer Entwicklung einer Atemwegsobstruktion. Bei obstruktiven Rauchern weisen die Atemwege fibrotische Veränderungen auf. Es entsteht eine Atemwegswandfibrose (Bosken et al., 1990). Diese dürfte der Hauptfaktor der irreversiblen Komponente der Atemwegsobstruktion bei Rauchern mit COPD sein (Saetta et al., 2001). Die Entwicklung der Atemflußbegrenzung in den zentralen Atemwegen bei der COPD ist mit einem Anstieg von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Atemwegswand (Di Stefano et al., 1996; O'Shaughnessy et al., 1997) und von neutrophilen Granulozyten im Atemwegslumen assoziiert (Keating et al., 1996).

Dies lässt eine selektive Passage von neutrophilen Granulozyten über das Epithel in das Atemwegslumen vermuten (Saetta et al., 1993). Im fortgeschrittenen Stadium kommt es bei einem Teil der Raucher zur Destruktion des Lungenparenchyms, welche zunächst durch die Proteolyse der normalen Matrixproteine verursacht wird. Ferner kommt es zusätzlich bei Exazerbationen durch Infekte, wie sie bei der COPD gehäuft auftreten, zu einem Anstieg von neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen mit zusätzlicher Sekretion von Mediatoren, Proteasen und Sauerstoffradikalen, welche zu einer weiteren Destruktion des Lungenparenchyms führen.

Die Destruktion der Alveolarwände ist ein charakteristisches Merkmal des Emphysems. In den emphysematösen Gebieten kommt es nun durch Reparaturmechanismen und Remodeling zur Synthese eines fibrotischen Gewebes, welches sich aus Elastin und Kollagen zusammensetzt (Vlahovic et al., 1999). So wurde beispielsweise im Lungengewebe von Patienten mit chronischer, emphysematöser Lungenerkrankung, welche sich einer chirurgischen Lungenvolumenreduktion unterzogen hatten, in 85 % der Fälle eine intraparenchymatöse Fibrose und eine Narbenbildung vorgefunden (Durante et al., 1998).

Bei chronischen Nikotinkonsum kommt es ähnlich wie bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose zu Veränderungen im zellulären Bild, welches durch eine starke Zunahme an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Dies lässt vermuten, dass diese Zellen auch bei der COPD und dem Emphysem an den fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind.

### **6.3 Differentialzytologisches und immunologisches Muster der BALF bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen**

Wie bereits im Abschnitt 5.2 aufgezeigt, scheinen bestimmte Zellen an der Entwicklung von fibrotischen Lungenstrukturveränderungen beteiligt zu sein. Daher soll hier die Differential- und Immunzytologie der BALF bei verschiedenen Lungenerkrankungen untersucht werden.

Bei gesunden Personen enthält die BALF bezogen auf die Gesamtzellzahl etwa 90 % Makrophagen, maximal 15 % Lymphozyten, bis zu 3 % neutrophile Granulozyten und bis zu 0,5 % eosinophile Granulozyten (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Tuberkulose, 1988). Im Rahmen von pathologischen Prozessen in der Lunge kommt es zu Veränderungen dieses Differentialzellbildes und es kann eine Beziehung zwischen bestimmten Lungenerkrankungen, der Zellzahl sowie dem Immunphänotyp von BAL-Lymphozyten festgestellt werden (Agostini et al., 1993).

### **6.3.1 Makrophagen**

Die Inhalation von Toxinen, organischem und anorganischem Material führt zu einer Rekrutierung von Makrophagen in die Lungen. Dort phagozytieren sie die unerwünschten Irritantien und zerstören diese wenn möglich. So ist beispielsweise die Phagozytose von Rauchpartikeln ein wichtiges Verteidigungsmittel zur Neutralisierung und Reinigung von toxischen Partikelteilen (Teresa und Tetley, 2002). Bei gesunden Rauchern ist die Gesamtzellzahl auf das 3- bis 4-fache des Normwertes erhöht (Mikuz und Gschwendtner, 2000). Dies ist in erster Linie auf eine Zunahme der Makrophagen zurückzuführen (Costabel, 1994).

Entsprechend wurde bei der Gruppe COPD ohne Emphysem der höchste Anteil an Makrophagen festgestellt (92,00 %). Bei der Gruppe COPD mit Emphysem wurde ebenfalls ein hoher Anteil an Makrophagen nachgewiesen (88,50 %). Dieses Ergebnis ist auf den hohen Nikotinkonsum in diesen beiden Gruppen zurückzuführen. Bei der Gruppe COPD ohne Emphysem zeigten sich in Bezug auf den Anteil von Makrophagen signifikante Unterschiede gegenüber den Gruppen Pneumonie und Asthma. Ferner wurde ein signifikant erhöhter Anteil an Makrophagen bei der Gruppe COPD mit Emphysem gegenüber der Gruppe Pneumonie festgestellt. Darüber hinaus war bei den Gruppen Pneumonie (67,5 %) und Asthma (81,5 %) der Anteil an Makrophagen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (89,75 %) signifikant erniedrigt.

### **6.3.2 Lymphozyten**

Es ist bekannt, dass zwar in Bezug auf die absolute Anzahl an Lymphozyten kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern besteht, jedoch der

prozentuale Anteil an Lymphozyten bei Rauchern niedriger liegt (Costabel, 1994). Während sich bei gesunden Nichtrauchern maximal 15 % Lymphozyten in der BALF finden, sind es bei Rauchern lediglich bis zu 7 % (Mikuz und Gschwendtner, 2000).

Demgemäß konnte der niedrigste prozentuale Anteil an Lymphozyten bei den Gruppen COPD ohne Emphysem (5,00 %) und COPD mit Emphysem (5,50 %) (die Gruppen mit dem höchsten Nikotinkonsum) festgestellt werden, mit signifikanten Unterschieden zur Gruppe Asthma, in welcher nur ein Proband rauchte (12,30 %;  $p=0,004$  bzw.  $p=0,012$ ).

### **6.3.3 Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten treten sowohl bei Rauchern (Hoser et al., 1999) als auch bei Personen mit chronischen und akuten Atemwegserkrankungen (Weinberger et al., 1978) vermehrt auf. So findet sich beispielsweise bei einer akuten bakteriellen Pneumonie eine starke Vermehrung von neutrophilen Granulozyten auf Durchschnittswerte von 70-80 % (Hopkins et al., 1989). Demgegenüber ist bei Rauchern der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten dem von gesunden Nichtrauchern gleich, während die Absolutzahl erhöht ist (Hoser et al., 1999).

Diese hohen Werte konnten bei den hier untersuchten Patienten der Gruppe Pneumonie nicht nachgewiesen werden. Der mediane relative Anteil an neutrophilen Granulozyten lag deutlich niedriger und betrug lediglich 17 %. Dennoch war der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten bei den Patienten der Gruppe Pneumonie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (17 % versus 1 %;  $p=0,008$ ). Bei der Gruppe COPD mit Emphysem ergab sich gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ebenfalls ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten (3 % versus 1 %;  $p=0,009$ ). Demgegenüber ergaben sich beim Vergleich der Gruppe COPD ohne Emphysem mit der gesunden Kontrollgruppe keine Unterschiede bei den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten (1 % versus 1 %).

Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich Patienten der Gruppe COPD mit Emphysem in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium befanden, welches durch gehäufte Exazerbationen gekennzeichnet ist.

#### **6.3.4 Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten sind wichtige Effektorzellen im Rahmen der Pathogenese des Asthma bronchiale (Kroegel, 2002) und sind normalerweise in der BALF von Patienten mit Asthma bronchiale auf 2-3 % erhöht (Walker et al., 1992; Kroegel et al., 1995).

Bei den hier untersuchten Patienten der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie und der gesunden Kontrollgruppe betrug der relative Anteil an eosinophilen Granulozyten 0 %. Demgegenüber wurden in der BALF der Patienten mit Asthma bronchiale eosinophile Granulozyten mit signifikanten Unterschieden zur gesunden Kontrollgruppe (1,80 % versus 0 %,  $p=0,002$ ) und zur Gruppe COPD ohne Emphysem (1,80 % versus 0 %;  $p=0,047$ ) sowie eine tendenzielle Signifikanz zur Gruppe COPD mit Emphysem (1,80 % versus 0 %;  $p=0,083$ ) festgestellt.

Der relativ niedrige Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BALF der Patienten der Gruppe Asthma lässt sich dadurch erklären, dass die hier eingeschlossenen Patienten lediglich ein leichtes allergisches Asthma bronchiale hatten. Ungeachtet dessen konnten auch hier signifikante Unterschiede bei der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Vergleich der Gruppe Asthma zu den anderen Vergleichsgruppen festgestellt werden. Dieses Ergebnis stützt auch die Arbeit von Walker et al, wonach eine Korrelation zwischen dem Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BALF und dem Schweregrad des Asthma bronchiale besteht (Walker et al., 1991). Zudem ist hierbei zu berücksichtigen, dass sich der größte Anteil an eosinophilen Granulozyten nicht in der BAL oder dem Blut, sondern im Gewebe befindet (1:100) (Kroegel, persönliche Mitteilung).

#### **6.4 CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Die Phänotypisierung von Lymphozyten erfolgt aufgrund der zugehörigen CD-Oberflächenantigene. Hierbei kann im wesentlichen zwischen den beiden Hauptgruppen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden werden. T-



Lymphozyten werden dabei durch das Oberflächenantigen CD3 gekennzeichnet und können in die Subpopulationen T-Helferzellen, welche neben CD3 auch CD4 exprimieren (CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten), und T-Suppressor-Zellen, welche neben CD3 auch CD8 exprimieren (CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten) eingeteilt werden. Die Verteilung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF ist bei der Diagnostik und der Beurteilung der Aktivität von Lungenerkrankungen von Bedeutung.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten wies die gesunde Kontrollgruppe den höchsten Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (64,60 %) und die Gruppe Asthma den niedrigsten Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (47,40 %) auf, wobei keine signifikanten Unterschiede bestanden. Demgegenüber wurde bei der Gruppe Asthma ein erhöhter Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (43,70 %) nachgewiesen und der geringste Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei den Gruppen Pneumonie (23,90 %) und COPD mit Emphysem (22,35 %) vorgefunden. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Pneumonie und Asthma ( $p=0,008$ ) sowie eine marginale Signifikanz im Vergleich der Gruppe Pneumonie zur gesunden Kontrollgruppe ( $p=0,074$ ). Des weiteren bestand eine marginale Signifikanz im Vergleich der Gruppe COPD mit Emphysem zur Gruppe Asthma ( $p=0,055$ ). Im Rahmen der Analyse der CD4/CD8-Quotienten wurden die höchsten Werte bei den Gruppen COPD mit Emphysem (2,61) und Pneumonie (2,43) festgestellt. Demgegenüber war der CD4/CD8-Quotient bei der Gruppe Asthma (1,08) deutlich niedriger. Beim Vergleich der CD4/CD8-Quotienten bei den verschiedenen Vergleichsgruppen, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Pneumonie und Asthma ( $p=0,018$ ).

Bereits in einer früheren Studie wurde festgestellt, dass die BALF sowohl von Nichtrauchern als auch von Rauchern einen relativen Anteil von 63-83 % T-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl enthält (Costabel et al., 1986). Demgegenüber variieren die Subpopulationen der T-Lymphozyten, die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, bei Nichtrauchern im Vergleich zu Rauchern. Dabei wurde bei Nichtrauchern ein Anteil von 40-70 %, bei Rauchern jedoch nur ein Anteil von 20-50 % CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtlymphozyten festgestellt (Costabel et al., 1986). Hingegen betrug der Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtlymphozyten 20-40 % bei Nichtrauchern und 30-70 % bei Rauchern. Während gesunde Nichtraucher in der BALF einen mittleren CD4/CD8-



Quotienten von 2,0 aufweisen, zeigen gesunde Raucher einen auf die Hälfte reduzierten CD4/CD8-Quotienten in der BALF (Costabel et al., 1986).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Bei der gesunden Kontrollgruppe, welche überwiegend aus gesunden Nichtrauchern bestand, war der Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten relativ hoch (64,60 %) und der Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Vergleich geringer (31,35 %). Der hieraus resultierende CD4/CD8-Quotient betrug 2,06.

Im Folgenden soll das Verhältnis der Expansion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Asthma bronchiale näher dargestellt werden. Immunhistologisch ist das Asthma bronchiale durch eine Anreicherung aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie aktivierter eosinophiler Granulozyten gekennzeichnet (Kroegel, 2002). Immunologisch finden sich beim extrinsischen Asthma bronchiale passagere, mit der Allergenexposition im Zusammenhang stehende aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den Atemwegen (Kroegel, 2002). Analysen von peripheren Blut- und BAL-Lymphozyten von atopischen Asthmatikern nach Allergenprovokation haben einen dynamischen Austausch von T-Lymphozyten zwischen diesen beiden Kompartimenten gezeigt, was auf einen selektiven Rückhalt von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den Atemwegen in Assoziation mit einem Anstieg von Aktivierungsmarkern hindeutet (Gerblich et al., 1984; Gerblich et al., 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit einer milden Form des extrinsischen Asthma bronchiale (Schweregrad I) untersucht, welche zur Zeit der Durchführung der BAL symptomfrei waren. Dies könnte erklären, weshalb weder erhöhte Werte von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten noch eine erhöhte Zahl von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF nachgewiesen werden konnten. Auffällig war jedoch hierbei, dass der CD4/CD8-Quotient bei den Patienten der Gruppe Asthma im Verhältnis zu den anderen Vergleichsgruppen sehr niedrig war (1,08).

## **6.5 Expression von $\alpha^E\beta_7$ auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei pulmonalen Erkrankungen**

Bei fibrotischen Lungenerkrankungen ist die Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF signifikant erhöht (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al., 1999). Dies lässt eine Beteiligung der  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Pathogenese von fibrotischen Lungenerkrankungen vermuten (Braun et al., 2003).

Wie bereits oben unter Kapitel 5.2 dargestellt, finden auch beim Emphysem als Folge der Alveolarwanddestruktion im Sinne einer „narbigen Heilung“ fibrotische Umbauprozesse statt. Diese sind von den fibrotischen Umbauprozessen in den Atemwegen bei der COPD zu unterscheiden. Somit treten bei der COPD mit Emphysem sowohl fibrotische Veränderungen in den emphysematösen Gebieten als auch eine Atemwegswandfibrose auf.

Hier stellt sich die Frage, ob zwischen dem Fortschreiten der fibrotischen Lungenstrukturveränderungen bei den Krankheitsstadien der COPD und dem Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein Zusammenhang besteht. Daher soll im Folgenden die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei verschiedenen Stadien der COPD (COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem) untersucht werden. Darüber hinaus sollen Vergleiche mit anderen Lungenerkrankungen (Pneumonie und allergisches Asthma bronchiale) sowie einer gesunden Kontrollgruppe erfolgen. Bei den Lungenerkrankungen Asthma, COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem handelt es sich um chronische Entzündungen, bei der Pneumonie um eine akute Entzündung der Lunge. Des weiteren soll das Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$ /CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten analysiert werden.

Im Hinblick auf die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten konnte bei den verschiedenen Vergleichsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier lag die Expression zwischen 71,40 % bei der gesunden Kontrollgruppe und 77,70 % bei der Asthmagruppe. Damit ist die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Vergleich zur Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erheblich höher. Dies wurde bereits von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Rihs et al., 1996; Lohmeyer et al, 1999).

Demgegenüber konnte bei den verschiedenen Lungenerkrankungen ein differentes Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dabei wurde bei der Gruppe COPD mit Emphysem die höchste Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (41,80 %) mit einem signifikanten Unterschied zu den anderen Gruppen festgestellt. Besonders auffällig war die signifikant erhöhte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Gruppe COPD mit Emphysem im Vergleich zur Gruppe COPD ohne Emphysem (41,80 % versus 21,15 %; p=0,031). Worauf diese erhöhte Expression

von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der COPD mit Emphysem zurückzuführen ist, ist derzeit noch nicht bekannt. Hier könnte ein Zusammenhang mit den fortgeschrittenen fibrotischen Veränderungen bei der COPD mit Emphysem bestehen. Die erhöhte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten könnte jedoch auch durch gehäuft auftretende Infektionen/Exazerbationen, welche bei der fortgeschrittenen COPD oft vorkommen, verursacht werden. Interessant ist deshalb auch das Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Pneumonie, einer akuten Entzündung, die in der Regel ohne fibrotische Veränderungen einhergeht. Bei den Patienten der Gruppe Pneumonie war die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten signifikant niedriger als bei der Gruppe COPD mit Emphysem (41,80 % versus 28,95 %;  $p=0,002$ ). Ungeachtet dessen war die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei den Patienten der Gruppe Pneumonie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (28,95 % versus 14,30 %;  $p=0,026$ ).

Damit sind die hier ermittelten Expressionsdichten mit den Arbeiten von Rihs et al. (1996) und Lohmeyer et al. (1999) vergleichbar, welche ebenfalls eine erhöhte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf bronchoalveolären CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei fibrotischen Lungenerkrankungen feststellten. In diesen Arbeiten wurde die Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf Blut- und BALF-CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von Patienten mit allergischem Asthma, Sarkoidose, idiopathischer pulmonaler Fibrose und exogen allergischer Alveolitis untersucht. Dabei handelt es sich um Lungenerkrankungen, welche durch verschiedene Fibrosegrade charakterisiert sind (Rihs et al., 1996). Hierbei wurden bei der Sarkoidose, exogen allergischen Alveolitis und idiopathischen pulmonalen Fibrose bis zu 70 %  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen. Der höchste Werte  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose festgestellt (Rihs et al., 1996). Bei der idiopathischer pulmonaler Fibrose handelt es sich um eine interstitielle Entzündung, welche mit ausgeprägten fibrotischen Umbauprozessen des Lungenparenchyms verbunden ist (Khalil und O'Connor, 2004). Auch Lohmeyer et al. konnten bei Patienten mit fibrotischen Lungenerkrankungen (idiopathische pulmonale Fibrose, exogen allergische Alveolitis, Sarkoidose Stadium II und III) eine signifikant erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisen (Lohmeyer et al., 1999).

Das Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten variiert bei verschiedenen fibrotischen Lungenerkrankungen. Obwohl, wie bereits oben dargestellt, das Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der COPD mit Emphysem mit 41,80 % signifikant erhöht war, liegt dieser Wert dennoch deutlich unter dem Wert von 70 % bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose und der exogen allergische Alveolitis.

Der niedrigere Expansionswert von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der COPD mit Emphysem im Vergleich zur idiopathischen pulmonalen Fibrose, exogen allergischen Alveolitis und der Sarkoidose im Stadium III läßt sich möglicherweise durch den geringeren Umfang der fibrogenen Entzündung bei dieser Erkrankung erklären. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche krankheitsspezifische Faktoren die Expansion der  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten modifizieren.

Für einen Zusammenhang zwischen der Expansion der  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten und dem Ausmaß von fibrotischen Lungenstrukturveränderungen spricht auch die von Lohmeyer et al. beschriebene stadienabhängige Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der Sarkoidose. So wurde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe im Stadium I ein signifikant niedrigerer Anteil an  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten ( $14,3 \pm 1,5$  %) festgestellt. Demgegenüber wurden in den Stadien II ( $50,0 \pm 3,8$  %) und III ( $64,0 \pm 4,8$  %) erhöhte Anteile an  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten nachgewiesen (Lohmeyer et al. 1999). Bei der Sarkoidose im Stadium I handelt es sich lediglich um eine Lymphadenopathie, während in den Stadien II und III Lungeninfiltrate nachweisbar sind. Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem Thorax-Röntgenbefund. Dabei erlaubt das Röntgenbild Rückschlüsse auf den Grad der Zerstörung des Lungenparenchyms und ist damit ein indirekter Indikator für den Grad der Lungenfibrose (Newman et al., 1997). Zudem könnte der Anteil an  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten von prognostischer Signifikanz sein, da Patienten im Stadium I (insbesondere Patienten mit Löfgren-Syndrom) zu einem akuten oder subakuten, reversiblen Krankheitsverlauf tendieren, während bei Patienten in den Stadien II und III viel häufiger eine chronisch-progressive Manifestation der Sarkoidose vorliegt (Lohmeyer et al., 1999).

Bei den hier untersuchten Patienten konnte im Vergleich der Gruppe COPD mit Emphysem (46,92 %) zur Gruppe COPD ohne Emphysem (28,67 %) ein

signifikanter Unterschied des Anteils an  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Damit könnte auch bei der COPD – ähnlich wie bei der Sarkoidose – ein Zusammenhang zwischen der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten und dem Ausmaß an fibrotischen Lungenstrukturveränderungen bestehen. Aufgrund des differenten Expressionsverhaltens von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei der COPD ohne Emphysem und der COPD mit Emphysem könnte die Analyse dieses Integrins zudem bei der Frage nach dem Vorliegen eines Emphysems hilfreich sein.

**Tabelle 8:  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei diversen Lungenerkrankungen im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen**

Arbeitsgruppe	Erkrankung	$\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten
Rihs et al.	Asthma	ca.15%
	idiopathische pulmonale Fibrose	ca.70%
	gesunde Kontrollgruppe	ca.11,20%
Lohmeyer et al.	idiopathische pulmonale Fibrose	74,50%
	exogen allergische Alveolitis	67,10%
	Sarkoidose I	16,00%
	Sarkoidose II	50,00%
	Sarkoidose III	64,00%
	gesunde Kontrollgruppe	28,00%
Erle et al.	gesunde Kontrollgruppe	29%
eigene Untersuchungs- ergebnisse	COPD ohne Emphysem	21,50%
	COPD mit Emphysem	41,80%
	Pneumonie	28,95%
	Asthma	20,40%
	gesunde Kontrollgruppe	14,30%

## 6.6 Funktion von $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten

Die funktionelle Bedeutung der  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten ist noch nicht eindeutig definiert. Es ist unklar, ob diese Zellen eine protektive oder pro-inflammatorische Funktion haben.

Der Zusammenhang zwischen der Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten und dem Ausmaß an fibrotischen Lungenstrukturveränderungen (z.B. bei der

idiopathischen pulmonalen Fibrose, der Sarkoidose II und III, der exogen allergischen Alveolitis und der COPD mit Emphysem) läßt eine Beteiligung der  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten am fibrotischen Umbaugeschehen vermuten. Noch nicht geklärt werden konnte jedoch, ob das Mikromilieu verbunden mit der Entwicklung einer Lungenfibrose eine Rolle bei der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf alveolären CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei entzündlichen bzw. fibrotischen Lungenerkrankungen spielt oder ob alveoläre  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten selbst an fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind.

Interessant ist die signifikant erhöhte Expansion  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Pneumonie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und die erhöhten Werte im Vergleich zur COPD ohne Emphysem und dem Asthma bronchiale, obwohl es sich bei der COPD ohne Emphysem und dem Asthma bronchiale um Erkrankungen mit fibrotischen Lungenstrukturveränderungen handelt. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass  $\alpha^E\beta_7$  auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten vermehrt bei Entzündungen exprimiert wird und es über den Weg einer chronischen Entzündung zu fibrotischen Umbauprozessen kommt. Für eine Förderung von Entzündungsprozessen könnte auch die im experimentellen Colitismodell durch eine Deletion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mittels anti- $\alpha^E\beta_7$ -mAk bei IL-2<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigte Reduktion von Darmentzündungen sprechen (Lúdvíksson et al., 1999). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen  $\alpha^E\beta_7$ -defiziente Mäuse eine verstärkte Entzündung der Haut, welches eine protektive Rolle dieser Zellen vermuten läßt (Schön et al., 2000). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Funktion der  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten möglicherweise im Kontext zum jeweiligen Gewebe zu verstehen ist. In der Lunge könnten  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten eine entzündungsfördernde Funktion haben und über den Weg einer chronischen Entzündung an fibrotischen Lungenumbauprozessen beteiligt sein. Gegen eine protektive Rolle von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Lunge könnte zum einen ihre Expansion bei chronischen interstitiellen fibrotischen Erkrankungen und zum anderen das nur marginale Vorkommen bei gesunden Individuen sprechen. Jedoch könnte auch das Mikromilieu bei entzündlichen und/oder fibrotischen Lungenerkrankungen zu einer Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Lunge führen.

## **6.7 Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und der relativen Zahl eosinophiler Granulozyten in der BALF bei allergischem Asthma bronchiale**

Es ist bekannt, dass bei Asthma bronchiale eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und dem Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BALF besteht (Walker et al., 1991). Da  $\alpha^E\beta_7$  als Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten beschrieben wurde (Rihs et al., 1996), stellt sich die Frage, ob zwischen dem Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dem relativen Anteil an eosinophilen Granulozyten eine Beziehung besteht.

So wurde von Rihs et al. beschrieben, dass der Patient aus der Asthmagruppe mit der höchsten Anzahl  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowohl die höchste BAL-Eosinophilie als auch den niedrigsten FEV<sub>1</sub>-Wert aufwies (Rihs et al., 1996). Ungeachtet dessen wurde bei den Patienten mit Asthma ein ähnlich niedriges Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wie bei der gesunden Kontrollgruppe festgestellt.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten der Asthmagruppe mit dem höchsten Anteil an  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (38,40 % bzw. 32,30 %) betrug der relative Anteil eosinophiler Granulozyten interessanterweise 0 %, so dass das Ergebnis von Rihs et al. insoweit nicht bestätigt werden konnte. Zudem war auch keine Korrelation zwischen der Expansion  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und der BAL-Eosinophilie nachweisbar. Schließlich wurde – wie auch von der Arbeitsgruppe Rihs et al. – bei den Patienten mit Asthma ein ähnlich niedriges Expansionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wie bei der gesunden Kontrollgruppe festgestellt (20,40 % bei der Gruppe Asthma versus 14,30 % bei der gesunden Kontrollgruppe).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass zumindest bei leichtem Asthma bronchiale keine erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten stattfindet. Zudem liegt auch keine Korrelation zwischen der Expansion  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dem relativen Anteil an eosinophilen Granulozyten vor.



## **6.8 Expressionsverhalten der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1**

Aktivierungsmarker sind bestimmte Oberflächenantigene, welche einen indirekten Hinweis auf den Aktivierungsgrad der Zelle geben. Die Einteilung der Aktivierungsmarker erfolgt abhängig von ihrer zeitlichen Expression nach Aktivierung der T-Lymphozyten. So können sehr frühe (CD69), frühe (CD25 und CD27), späte (HLA-DR) und sehr späte (VLA-1) Aktivierungsmarker unterschieden werden (Hol et al., 1993). CD25 deutet damit auf eine aktuelle Aktivierung von T-Lymphozyten hin, während VLA-1 und HLA-DR im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge exprimiert werden (Kroegel et al., 1995).

### **6.8.1 Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Wie bereits oben aufgezeigt, handelt es sich bei CD25 um einen Aktivierungsmarker, welcher bereits etwa 24 Stunden nach Aktivierung der T-Lymphozyten auftritt.

Im Rahmen der hier vorgenommenen Untersuchungen konnte bei den Gruppen COPD ohne Emphysem (15,15 %) und COPD mit Emphysem (16,30 %) eine höhere Expression von CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Vergleich zu den Gruppen Pneumonie (9,15 %), Asthma (14,80 %) und der gesunden Kontrollgruppe (12,60 %) festgestellt werden. Demgegenüber war die Expression von CD25 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten geringer und unterschied sich nicht wesentlich bei den Vergleichsgruppen.

Bei der Untersuchung des Expressionsverhaltens von CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde bei den Patienten mit Pneumonie kein Anstieg festgestellt. Vielmehr fanden sich in dieser Gruppe die niedrigsten Werte, obwohl die Patienten jeweils akute Entzündungen der Lunge aufwiesen, die BAL nicht am ersten Tag durchgeführt wurde und folglich eine vermehrte Expression von CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu erwarten war.

Demgegenüber wurden bei den Gruppen COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem eine erhöhte Expansion von CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt. Dieses Ergebnis läßt sich auf den chronischen Entzündungsvorgang bei der



COPD zurückführen. So wurde bereits in einer früheren Studie gezeigt, dass die Expression von CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen (Asthma, Sarkoidose, idiopathische pulmonale Fibrose, exogen allergische Alveolitis) im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöht ist (Rihs et al., 1996).

### **6.8.2 Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Bei HLA-DR handelt es sich um einen Aktivierungsmarker, welcher erst nach etwa 4 Tagen nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert wird.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten wurde bei den Gruppen COPD ohne Emphysem (6,60 %) und COPD mit Emphysem (5,70 %) die stärkste Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt. Dagegen war bei der Gruppe Asthma und der gesunden Kontrollgruppe nur eine geringe Expression von HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisbar. Bei der Gruppe COPD mit Emphysem (5,70 %) konnte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (2,90 %;  $p=0,011$ ) sowie zur Asthmagruppe (2,70 %;  $p=0,016$ ) eine signifikant erhöhte Expression von HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt werden. Entsprechende Ergebnisse wurden von Rihs et al. bei anderen chronischen Lungenerkrankungen (Sarkoidose, idiopathische pulmonale Fibrose, exogen allergische Alveolitis) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorgefunden. Während jedoch Rihs et al. eine höhere Expression von HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei der Asthmagruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellten, waren die Werte bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Asthma und bei den Patienten der gesunden Kontrollgruppe ähnlich niedrig. Dieses Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Asthma symptomfrei waren.

Im Gegensatz zur Expression von HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten konnte bei den verschiedenen Vergleichsgruppen in Bezug auf das Expressionsverhalten von HLA-DR auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten kein nennenswerter Unterschied nachgewiesen werden. In allen Vergleichsgruppen war die Expansion von HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten gering. Dies widerspricht den von Rihs et al. festgestellten Werten,

wonach bei allen Patientengruppen eine erhöhte Expression von HLA-DR auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorlag (Rihs et al., 1996).

### **6.8.3 Expression des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Das Oberflächenantigen VLA-1 ist ein Aktivierungsmarker, welcher erst nach mehreren Wochen nach Aktivierung der T-Lymphozyten nachgewiesen werden kann.

Der Aktivierungsmarker VLA-1 zeigte ein unterschiedliches Expressionsverhalten auf den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. VLA-1 wurde auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei den Gruppen COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem um etwa 15-20 % stärker als bei den Gruppen Asthma, Pneumonie und der gesunden Kontrollgruppe exprimiert. Dieses Ergebnis ist auf die langanhaltende Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Rahmen chronischer Entzündungen zurückzuführen. Demgegenüber zeigte sich auf den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein umgekehrtes Expressionsmuster. Hier wurde der Aktivierungsmarker VLA-1 stärker bei den Gruppen Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe als bei den Gruppen COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem exprimiert. Ungeachtet dessen konnten weder im Expressionsverhalten von VLA-1 auf den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten noch auf den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

### **6.8.4 Untersuchung des Expressionsverhaltens von CD25, HLA-DR und VLA-1 beim Asthma bronchiale**

Das Expressionsverhalten der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Patienten mit Asthma bronchiale wurde bereits in vielen Studien untersucht, welche jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Dies ist vermutlich auf eine uneinheitliche Einteilung der verschiedenen Stadien des Asthma bronchiale zurückzuführen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Asthma wurde im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und

folglich auch keine Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass die hier untersuchten Patienten lediglich eine Asthma bronchiale des Schweregrades I aufwiesen und symptomfrei waren. Dies wird durch die Untersuchungen von Robinson et al. gestützt, in welchen ein Zusammenhang zwischen der Expansion von CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und dem Schweregrade des Asthma bronchiale nachgewiesen wurde. Während die Expansion von CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Patienten mit symptomatischen Asthma bronchiale gegenüber Patienten mit symptomfreien Asthma bronchiale und der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht war, konnten auch Robinson et al. keine erhöhte Expansion von CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Patienten mit symptomfreien Asthma bronchiale im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe feststellen. Schließlich bestätigen die Untersuchungen von Robinson et al. auch, dass bei der Expression von HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Patienten mit Asthma bronchiale (unabhängig vom Schweregrad) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bestehen (Robinson et al., 1993).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte ebenso wie von Robinson et al. bei Patienten mit Asthma bronchiale keine Unterschiede bei der Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Robinson et al., 1993).

Demgegenüber stellten Walker et al. bei ihren Untersuchungen eine erhöhte Expression von CD25, HLA-DR und VLA-1 sowohl auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten als auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten fest (Walker et al., 1991).

Die unterschiedlichen Ergebnisse machen deutlich, dass im Hinblick auf das Expressionsverhalten von Aktivierungsmarkern auf T-Lymphozyten noch weitere Untersuchungen erforderlich sind.

## **6.9 Beziehung zwischen $\alpha^E\beta_7$ und der Expression der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1**

Neben CD25, HLA-DR und VLA-1 wurde auch  $\alpha^E\beta_7$  als Aktivierungsmarker von T-Lymphozyten beschrieben (Rihs et al., 1996). Damit stellt sich die Frage, ob zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  sowie der Expression von CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ein Korrelationsverhältnis besteht.

Bei der Gruppe Pneumonie konnte eine Korrelation sowohl zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und CD25 (Korrelationskoeffizient=-0,564;  $p=0,025$ ) als auch zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Korrelationskoeffizient=0,636;  $p=0,048$ ) aufgezeigt werden. Patienten der Gruppe Pneumonie mit einer hohen Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wiesen zwar eine geringere Expression von CD25, aber eine höhere Expression von VLA-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf. Des weiteren bestand bei der gesunden Kontrollgruppe eine Korrelation zwischen dem Expressionsverhalten von  $\alpha^E\beta_7$  und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Korrelationskoeffizient=0,874;  $p=0,005$ ), wobei eine erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mit einer erhöhten Expansion von VLA-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten einherging.

Weitere Korrelationen zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  sowie CD25, HLA-DR und VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten konnten nicht nachgewiesen werden. So wurde auch in einer früheren Studie, in welcher eine Untersuchung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf Expressionsmuster von bestimmten Aktivierungsmarkern (HLA-DR, HLA-DQ, CD25, CD39, CD54 und CD69) bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose, Sarkoidose, exogen allergischen Alveolitis und einer gesunden Kontrollgruppe erfolgte, keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und diesen Aktivierungsmarkern festgestellt (Lohmeyer et al., 1999). Zu diesem Ergebnis kamen auch Rihs et al., welche weder bei *in vitro*-Experimenten noch bei Analysen der BALF von Patienten mit Asthma bronchiale, Sarkoidose, idiopathischer pulmonaler Fibrose, exogen allergischer Alveolitis und einer gesunden Kontrollgruppe eine Korrelation zwischen der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR sowie der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  nachweisen konnten (Rihs et al., 1996).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Lungenerkrankungen mit fibrotischen Veränderungen (z.B. COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Asthma bronchiale, idiopathische pulmonale Fibrose, Sarkoidose, exogen allergische Alveolitis) keine Korrelationen zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und den hier untersuchten Aktivierungsmarkern CD25, HLA-DR und VLA-1 besteht. Dies legt den Schluß nahe, dass eine Expression von  $\alpha^E\beta_7$  bei fibrotischen Umbauprozessen der Lungen weder an eine Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD25 noch an die der späten Aktivierungsmarker HLA-DR und VLA-1 gebunden ist.

## 7 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in der BALF nicht nur an fibrotische Lungenstrukturveränderungen gebunden ist, sondern auch im Rahmen von akuten Entzündungen vorkommt. So konnte bei Patienten mit akuter Pneumonie im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten eine signifikant erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten in der BALF nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Entzündungen sein sowie auf eine Beteiligung von  $\alpha^E\beta_7$  an fibrotischen Umbauprozessen bei länger anhaltenden Entzündungen hindeuten. Die genaue Funktion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten im Rahmen entzündlicher bzw. fibrotischer Lungenerkrankungen konnte jedoch nicht geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Insbesondere bleibt offen, ob  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten selbst an entzündlichen bzw. fibrotischen Prozessen beteiligt sind oder ob es sich lediglich um ein Epiphänomen handelt.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl bei entzündlichen als auch bei fibrotischen Lungenerkrankungen keine Korrelation zwischen der Expression von  $\alpha^E\beta_7$  und den Aktivierungsmarkern CD25, HLA-DR und VLA-1 auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten besteht. Dies legt den Schluß nahe, dass eine Expression von  $\alpha^E\beta_7$  auf  $\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei fibrotischen Umbauprozessen der Lungen weder an eine Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD25, noch an die der späten Aktivierungsmarker HLA-DR und VLA-1 gebunden ist.

In dieser Arbeit war eine statisch signifikant erhöhte Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten bei Patienten mit COPD mit Emphysem im Vergleich zu Patienten mit COPD ohne Emphysem nachweisbar. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, dass die Expansion von  $\alpha^E\beta_7^+/\text{CD4}^+$ -T-Lymphozyten als diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen COPD ohne Emphysem und COPD mit Emphysem dienen könnte.

# Literaturverzeichnis

Agostini C, Chilosi M, Zambello R, Trentin L, Semenzato G. Pulmonary immune cells in health and disease: lymphocytes. *Eur Respir J* 1993; 6:1378-1401.

Ancochea J, Gonzalez A, Sanchez MJ, Aspa J, Lopez-Botet M. Expression of lymphocyte activation surface antigens in bronchoalveolar lavage and peripheral blood cells from young healthy subjects. *Chest* 1993; 104:32-37.

Barnard JA, Warwick GJ, Gold LI. Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology* 1993; 105:67-73.

Bergofsky EH. Respiratory failure in disorders of the thoracic cage. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:643-669.

Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74:185-95.

Boenisch G, Fischer H, Fleischer W, Wenske H. Die Lungenfunktionsprüfung in der Praxis. *Pneumologische Notizen. Sonderausgabe* 2003; ISSN 1430-6840. Seite 7-21.

Bosken CH, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Small airway dimension in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:563-570.

Braun RK, Foerster M, Grahmann PR, Haefner D, Workalemahu G, Kroegel C. Phenotypic and molecular characterization of CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in bronchoalveolar lavage from patients with interstitial lung diseases. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 54:19-27.

Brew R, West DC, Burthem J, Christmas SE. Expression of the human mucosal lymphocyte antigen, HML-1, by T cells activated with mitogen or specific antigen in vitro. *Scand J Immunol* 1995; 41:553-562.

Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6642-6646.

Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Oxidant mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1987; 79:1665-1673.

Carre PC, Mortenson RL, King TE, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J clin Invest* 1991; 88:1802-1810.

Cepek KL, Parker CM, Madara JL, Brenner MB. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993; 150:3459-3470.

Cepec KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the  $\alpha^E\beta_7$  integrin. *Nature* 1994; 372:190-193.

Cerf-Bensussan N, Begue B, Gagnon J, Meo T. The human intraepithelial marker HML-1 is an integrin consisting of a beta 7 subunit associated with a distinctive alpha chain. *Eur J Immunol* 1992; 22:273-277.

Costabel U. Atlas der bronchoalveolären Lavage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994, Seite 1, 12, 26.

Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Ruhle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90:39-44.

Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Tuberkulose. Empfehlungen zur diagnostischen bronchoalveolären Lavage. *Prax Klin Pneumol* 1988; 42:119-122.

Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration in the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:629-632.

Dockery DW, Speizer FE, Ferris BG Jr, Ware JH, Louis TA, Spiro A 3rd. Cumulative and reversible effects of lifetime smoking on simple tests of lung function in adults. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:286-292.

Duarte IG, Gal AA, FCCP; Mansour KA, Lee RB, Miller JI. Pathologic findings in lung volume reduction surgery. *Chest* 1998;113:660-664.



Erle DJ, Brown T, Christian D, Aris R. Lung epithelial lining fluid T cell subsets defined by distinct patterns of  $\beta 7$  and  $\beta 1$  integrin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* Vol 1994; 10:237-244.

Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 25:1645-1648.

Gadek JE; Hunninghake GW, Zimmerman R, Kelman J, Fulmer J, Crystal RG. Pathogenetic studies in idiopathic pulmonary fibrosis: Control of neutrophil migration by immune complexes *Chest* 1979; 75S:264S-265S.

Gerblich AA, Campbell AE, Schuyler MR. Changes in T-lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N Engl J Med* 1984; 310:1349-1352.

Gerblich AA, Salik H, Schuyler MR. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:533-537.

Gillissen A, Ewig S, Juergens UR, Köhnlein T, Merget R, Neumeister W, Petro W, Rasche K, Schäfer H, Schmidt B, Stamatis G, Steinkamp G, Welte T, Witt C. Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung. Bremen. UNI-MED Verlag AG. 2000, Seite 75.

Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 1993; 48:953-954.

Herold G et al. *Innere Medizin*. Köln, 1999, Seite 256-258.

Hol BE, Hintzen RQ, Van Lier RA, Alberts C, Out TA, Jansen HM. Soluble and cellular markers of T cell activation in patients with pulmonary sarkoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:643-649.

Hopkins H, Stull T, Von Essen SG, Robbins RA, Rennard SL. Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia. *Chest* 1989; 95:1021-1027.

Hoser G, Kawiak J, Domagala-Kulawik J, Kopinski P, Droszcz W. Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37:25-30.



Hunninghake GW, Gadek JE, Lawley TJ, Crystal RG. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J clin Invest* 1981; 68:259-269.

Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979; 97:149-206.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.

Iwainky H, Winsel K, Grollmuss H, Unger U. Bronchoalveoläre Lavage. *Z Erkrank Atm Org.* 1985; 164:231-240.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:S28-S38.

Karecla PI, Bowden SJ, Green SJ, Kilshaw PJ. Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin  $\alpha$  M290  $\beta$  7 ( $\alpha$  E  $\beta$  7). *Eur J Immunol* 1995; 25:852-856.

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530-534.

Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ* 2004; 171: 153-160.

Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren HW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:155-162.

Kilshaw PJ. Expression of the mucosal T cell integrin  $\alpha$  M290  $\beta$  7 by a major subpopulation of dendritic cells in mice. *Eur J Immunol* 1993; 23:3365-3368.

Kilshaw PJ, Karecla P. Structure and function of the mucosal T-cell integrin  $\alpha$  E  $\beta$  7. *Biochem Soc Trans* 1997; 25:433-439.

Kilshaw PJ, Murrant SJ. Expression and regulation of beta 7 (beta p) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur J Immunol* 1991 21, 2591-2597.

Kilshaw PJ, Murrant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 1990; 20:2201-2207.

Konietzko N, Fabel H. Weißbuch Lunge. Stuttgart-New York: Thieme 2000.

Kroegel C, Häfner D, Walker C, Luttmann W, Matthys H, Virchow JC jr. Immunpathogenese des allergischen Asthma bronchiale. Nachweis aktivierter CD25-CD4-Lymphozyten und Freisetzung von Zytokinen im Bronchoalveolarraum nach segmentaler Allergenprovokation. *Dtsch Med Wschr* 1995; 120:10-17.

Kroegel C. Asthma bronchiale. Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Thieme, Stuttgart, New York 2002, Seite 2-6, 135

Kroegel, C, Virchow JC jr, Walker CT. Lymphocyte activation in bronchial asthma. *N Engl J Med* 1993; 328:1639-1640.

Kylstra JA, Rausch DC, Hall KD, Spock A. Volume-controlled lung lavage in the treatment of asthma, bronchiectasis, and mucoviscidosis. *Am Rev Resp Dis* 1971; 103:651-665.

Lohmeyer J, Friedrich J, Grimminger F, Maus U, Tenter R, Morr H, Velcovsky HG. Expression of mucosa-related integrin  $\alpha^E\beta_7$  on alveolar T cells in interstitial lung diseases. *Clin Exp Immunol* 1999; 116:340-346.

Lomas DA, Silverman EK. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001; 2:20-26.

Lopez AD, Murray CJL. The global burden of disease, 1990 – 2020. *Nature Med* 1998; 4:1241-1243.

Lúdvíksson BR, Strober W, Nishikomori R. Hasan SK, Ehrhardt RO. Administration of mAb Against  $\alpha^E\beta_7$  prevents and ameliorates immunization-induced colitis in IL-2<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of Immunology*, 1999; 162:4975-4982.

Lynch JP 3rd, Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Strieter RM. Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:1433-1439.

Matthys H. Pneumologie. Berlin-Heidelberg - New York - London – Paris - Tokyo. Springer 1988.

Mikuz G, Gschwendtner A. Wertigkeit der Lavage in der Diagnostik von Lungenerkrankungen. Verh Dtsch Ges Path 2000; 84:129-135.

Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarkoidosis. N Engl J Med 1997; 336:1224-1234.

Niewoehner DE, Kleinerman J, Rice DB. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. N Engl J Med 1974; 291:755-758.

Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. Am Rev Respir Dis 1992; 145:922-927.

O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV<sub>1</sub>. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155:852-857.

Ozaki T, Hayashi H, Tani K, Ogushi F, Yasuoka S, Ogura T. Neutrophil chemotactic factors in the respiratory tract of patients with chronic airway diseases or idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev. Respir Dis 1992; 145:85-91.

Peat JK, Woolcock AJ, Cullen K. Decline of lung function and development of chronic airflow limitation: a longitudinal study of non-smokers and smokers in Busselton, Western Australia. Thorax 1990; 45:32-37.

Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. J Lab Clin Med 1974; 84:559-573.

Rihs S, Walker C, Virchow JC, Boer C, Kroegel C, Giri SN, Braun RK. Differential expression of  $\alpha^E\beta_7$  integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by  $\alpha^4\beta_1$ -integrin crosslinking and TGF $\beta$ . Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15:600-610.

Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. Thorax 1993; 48:26-32.

Rubin R. Bronchoalveoläre Lavage. Z Erkrank Atm Org 1985; 164:4-18.

Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1304-1390.

Schieferdecker HL, Ullrich R, Breckwoldt AN, Schwarting R, Stein H, Riecken EO, Zeitz M. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 1990; 144:2541-2549.

Schön MP, Schön M, Warren HB, Donohue JP, Parker CM. Cutaneous inflammatory disorder in integrin  $\alpha_E$  (CD103)-deficient mice. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 6583-6589.

Selecky PA, Wasserman K, Benfield JR, Lippmann M. The clinical and physiological effect of whole-lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis: A ten-year experience. *Ann Thorac Surg* 1977; 24:451-461.

Shaw SK, Cepek KL, Murphy EA, Russell GJ, Brenner MB, Parker CM. Molecular cloning of the human mucosal lymphocyte integrin alpha E subunit. Unusual structure and restricted RNA distribution. *J Biol Chem*. 1994; 269:6016-6025.

Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121:156S-159S.

Trollmo C, Nillson IM, Sollerman C, Tarkowski A. Expression of the mucosal lymphocyte integrin alpha E beta 7 and its ligand E-cadherin in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1996; 44 :293-298.

Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Crabtree GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:421-452.

Ullmer E, Solèr M. Asthma bronchiale und chronisch-obstruktive Lungenkrankheit (COPD). *Internist* 1999; 40:837-843.

Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:2086-2092.

Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC jr. Allergic and non-allergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine

production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:109-115.

Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:935-942.

Weinberger SE, Kelman JA, Elson NA, Young RC Jr, Reynolds HY, Fulmer JD, Crystal RG. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 1978; 89:459-466.

Wise RA. Changing smoking patterns and mortality from chronic obstructive pulmonary disease. *Prev Med* 1997; 26:418-421.

World Health Organisation. WHO report of an expert committee: Definition and diagnosis of pulmonary disease with special reference to chronic bronchitis and emphysema. *WHO Techn Rep Ser* 1961; 213:14-19.

Worth H, Buhl R, Cegla U, Crië CP, Gillissen A, Kardos P, Köhler D, Magnussen H, Meister R, Nowak D, Petro W, Rabe KF, Schultze-Werninghaus G, Sitter H, Teschler H, Welte T, Wettengel R. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 2002; 56:704-738.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: $\alpha^E\beta_7$ „gating method“ der durchflußzytometrischen Analyse.....	32
Abbildung 2: Absolute Verteilung nach Geschlechtern der Patienten mit COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe .....	34
Abbildung 3: Altersverteilung der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.....	36
Abbildung 4: Rauchverhalten der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Dargestellt sind die packyears der einzelnen Patienten (Punkte), sofern bekannt, und die Mediane der einzelnen Gruppen (horizontale Striche).....	37
Abbildung 5: Relativer Makrophagenanteil bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. ....	40
Abbildung 6: Relativer Anteil neutrophiler Granulozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.....	41
Abbildung 7: Relativer Anteil an Lymphozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. ....	41
Abbildung 8: Relativer Anteil eosinophiler Granulozyten bezogen auf die Gesamtzellzahl in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt.....	42
Abbildung 9: Relativer Anteil der CD4 <sup>+</sup> -Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der CD3 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. ....	44

- Abbildung 10: Relativer Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen an den CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 45
- Abbildung 11: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 48
- Abbildung 12: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 49
- Abbildung 13: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 49
- Abbildung 14: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 50
- Abbildung 15: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 50
- Abbildung 16: Relativer Anteil des Aktivierungsmarkers VLA-1 auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 51
- Abbildung 17: Intensität der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. .... 53
- Abbildung 18: Intensität der  $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem,

Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten sind als Box-Plots dargestellt. ....	53
Abbildung 19: Histogramme der $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei einem Patienten mit COPD und Emphysem mit 59,9 % $\alpha^E\beta_7$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten (A) und einer gesunden Kontrolle mit 11,5 % $\alpha^E\beta_7$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten (B). Die Daten eines repräsentativen Patienten aus der jeweiligen Gruppe sind dargestellt. ....	54
Abbildung 20: Korrelation zwischen $\alpha^E\beta_7$ und CD25 auf CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei der Gruppe Pneumonie (A); Korrelation zwischen $\alpha^E\beta_7$ und VLA-1 auf CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei der Gruppe Pneumonie (B); Korrelation zwischen $\alpha^E\beta_7$ und VLA-1 auf CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei der gesunden Kontrollgruppe (C). ....	55
Abbildung 21: Beziehung zwischen der Expansion von $\alpha^E\beta_7^+$ /CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten und des relativen Anteils eosinophiler Granulozyten in der BALF von Patienten mit leichtem Asthma bronchiale (Schweregrad I). ....	56



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der ausgewerteten Patientengruppen .....	28
Tabelle 2: Altersverteilung der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.....	35
Tabelle 3: BALF-Volumen und Gesamtzellzahl der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe. ....	38
Tabelle 4: Relative Anteile CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Zellen an CD3 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.....	43
Tabelle 5: Verhältnis an CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten zu CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.....	44
Tabelle 6: Relativer Anteil der Aktivierungsmarker CD25, HLA-DR und VLA-1 an CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe. ....	46
Tabelle 7: Relativer Anteil von $\alpha^E\beta_7$ auf CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten in der BALF der Gruppen COPD ohne Emphysem, COPD mit Emphysem, Pneumonie, Asthma und der gesunden Kontrollgruppe. Angegeben sind Median, Maximum und Minimum sowie die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Vergleichsgruppe.....	52
Tabelle 8: $\alpha^E\beta_7$ -Expression auf CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten bei diversen Lungenerkrankungen im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen.....	69

# Danksagung

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Prof. Dr. Dr. Claus Kroegel, Leiter des Forschungsbereichs Pneumologie und Allergologie an der Universität Jena, für die Überlassung des Themas sowie für die großzügige Unterstützung und die zahlreichen Hinweise bei der Anfertigung der Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Herrn Dipl.-Biol. Martin Förster möchte ich für die freundliche und geduldige Unterstützung bei wissenschaftlichen und technischen Fragen danken.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Dr. Ruedi Braun, welcher vor allem die wissenschaftliche Anfangsphase dieser Arbeit sehr unterstützte.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Heike Ferchland
Geburtsdatum/-ort	11.08.1975 in Halle/Saale
Anschrift	Königsberger Str. 2 78467 Konstanz
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1982-1990	Polytechnische Oberschule in Halle/Saale
1990-1996	Gymnasium in Konstanz; Abitur

## Studium

08/96	Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fach: Humanmedizin
08/98	Ärztliche Vorprüfung
08/99	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/01	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/02	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Praktische Ausbildung

02/99	Famulatur Pädiatrie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/99	Famulatur HNO, Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/00-03/00	Tropenmedizinischer Lehrgang, Universitätsklinik Leipzig
08/00	Famulatur Allgemeinmedizin, allgemeinmedizinische Praxis Konstanz
10/01-02/02	1. Teil Praktisches Jahr: Neurologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
02/02-06/02	2. Teil Praktisches Jahr: Innere Medizin, Abteilung Kardiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
06/02-09/02	3. Teil Praktisches Jahr: Chirurgie, Abteilung Chirurgische Intensivstation, Friedrich-Schiller-Universität Jena

## Promotion

Doktorvater: Professor Dr. Dr. Kroegel  
 „Immunzytologische Charakterisierung bronchoalveolärer T-Lymphozyten im Rahmen pulmonaler Erkrankungen – Expansion  $\alpha\beta_7^+$ /CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und ihre diagnostische Bedeutung“

**Ärztliche Tätigkeit**

03/03-08/04

Ärztin im Praktikum, Innere Medizin II, Universitätsklinik  
Ulm, Kardiologie

seit 10/04

Assistenzärztin, Praxis für Allgemeinmedizin Konstanz  
Dr. med. Hannelore Ferchland**Veröffentlichungen**

Ferchland H, Braun RK, Schumann C, Foerster M, Kroegel C. The expansion of CD103+CD4+-T-lymphocytes in the broncho-alveolar compartment. Comparison between COPD with and without emphysema and bronchial asthma. Am J Respir Crit Care Med 2001, 163: A695

Ferchland H, Braun RK, Schumann C, Foerster M, Kroegel C. Expansion von CD103+CD4+-T-Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage. Vergleich zwischen COPD mit und ohne Emphysem und Asthma bronchiale. Pneumologie 2001, 55: S15

# Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. C. Kroegel, Dipl.-Biol. M. Förster, Dr. R. Braun,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und  
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Konstanz, den 28.01.2005

Heike Ferchland